

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE FIDALGO RIBEIRO

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A MOLÉCULA CD28 DE
LINFÓCITOS DE GALINHA

CURITIBA

2012

CAROLINE FIDALGO RIBEIRO

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A MOLÉCULA CD28 DE
LINFÓCITOS DE GALINHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em ciências biológicas.

Orientador:
Profº Dr Silvio Marques Zanata

Co-orientadoras:
Profª Dr.^a Adriana Frolich Mercadante
Profª Dr.^a Michele Dietrich Moura Costa

CURITIBA

2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A MOLECULA CD28 DE LINFÓCITOS DE GALINHA”

por

CAROLINE FIDALGO RIBEIRO

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata (presidente)

Profª. Drª. Giseli Klassen

Profª. Drª. Juliana Ferreira de Moura

Curitiba, 13 de novembro de 2012.

*Ao meu Orientador, Professor
Sílvia Marques Zanata.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Jonas e Concepcion, e à minha querida irmã, Fernanda, por todo o amor, carinho, incentivo e apoio.

Ao Henrique pelo amor e compreensão, por estar disposto a me levar a faculdade em finais de semana, a me fazer companhia durante experimentos e me ouvir falar sobre eles.

Ao meu orientador, professor Silvio Zanata, pelos ensinamentos, pela atenção e pela oportunidade.

A minha co-orientadora, professora Adriana Mercadante, pela atenção, por sempre me ajudar quanto as dúvidas de biologia molecular e principalmente por me orientar quando o professor Silvio não estava no país.

A minha querida amiga Michele, por ser muito mais que uma co-orientadora e um exemplo de pessoa, por me ensinar tudo que eu sei. Muito obrigada pela ajuda e atenção em todos esses anos, desde a iniciação científica até aqui.

Ao meu querido amigo Luiz, pela amizade, ajuda, ensinamentos e companhia nos almoços.

Ao Max, por me ajudar durante todo o mestrado, dando opiniões sempre que eu precisei.

A todos meus amigos do laboratório de Neurobiologia, por deixarem os dias e os experimentos mais agradáveis.

A CAPES, ao programa de pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e a UFPR.

RESUMO

CD28 de mamífero é uma glicoproteína com um importante papel na ativação de células T, através de sua interação com seus ligantes CD80 e CD86. Para se tornarem ativadas, células T naíve precisam reconhecer um peptídeo não próprio em moléculas MHC específicas. Entretanto, as células não estarão prontas para proliferar e iniciar a resposta imune sem o sinal co-estimulatório. Esse sinal ocorre através da interação entre CD28 e seus ligantes, induzindo as células T a proliferarem e expressarem IL-2. Em galinhas, CD28 possui propriedades funcionais similares, inclusive a ativação de células T; porém, seu perfil de expressão em células aviárias é desconhecido. Enquanto há inúmeros estudos sobre CD28 humano ou murino, há uma pequena quantidade de estudos acerca de CD28 de aves. Portanto, clonamos toda a proteína CD28 de galinha e sua porção extracelular em um plasmídeo reengenheirado eucarioto (pcDNA3.1(-)6His) e procarioto (pET28a(+)) respectivamente, visando a produção de uma ferramenta biotecnológica que auxilie o estudo do sistema imunológico de aves e o papel de CD28 nele. A proteína heteróloga expressa em bactérias foi purificada a partir de corpos de inclusão usando cromatografia de afinidade por metal imobilizado. Soro hiperimune foi gerado em camundongos por três imunizações intraperitoniais com a porção extracelular de CD28 como antígeno. Os anticorpos policlonais reconhecem tanto o CD28 expresso em células 293T, quanto a proteína endógena expressa em células T. Esplenócitos foram fusionados a células mielóides (P3.653) e hibridomas estáveis reativos a CD28 foram obtidos. Juntos, estes resultados sugerem que o antígeno expresso em bactéria é um imunógeno adequado para a obtenção de anticorpos contra a proteína expressa em células sanguíneas de aves.

Palavras-chave: CD28, galinha, anticorpo monoclonal.

ABSTRACT

Mammalian CD28 is a glycoprotein with an important role in T cells activation, through interaction with its ligands CD80 and CD86. To become activated, naïve T cells need to recognize a non self peptide in appropriate MHC molecule. However, cells are not able to proliferate and initiate immune response without a co-stimulatory signal. This signal occurs through interaction between CD28 and its ligands, inducing T cells proliferation and expression of IL-2. In chickens CD28 has similar functional properties, including T cells activation; however its expression profile in avian blood cells is unclear. While there are extensive studies about human or mouse CD28, there is a small amount of studies on avian CD28 molecule. Thus, we cloned the avian CD28 full-length and its extracellular domain in a reengineered eukaryote (pcDNA3.1(-)6His) and prokaryote (pET28a(+)) vectors, respectively, in order to produce a biotechnological tool to help in the avian immune system, and the role of CD28 in it. Heterologous protein expressed in bacterial cells was purified from inclusion bodies using immobilized metal affinity chromatography. Hyperimmune sera were raised in mice after three intraperitoneal immunizations with the extracellular CD28 antigen. The polyclonal antibodies recognized both full-length avian CD28 over-expressed in 293 cells and endogenous CD28 expressed by chicken lymphocytes. Splenocytes were fused with a myeloid cell lineage (P3.653) and stable hibridomas were obtained, with specific anti-CD28 activity. Taken together, these results suggested that the antigen expressed in bacteria is a suitable immunogen to raise antibodies against the full-length glycoprotein expressed by avian blood cells.

Word Keys: CD28, chicken, monoclonal antibody.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA GLICOPROTEÍNA CD28	19
FIGURA 2 - MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T POR CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS.....	21
FIGURA 4 - SEQUÊNCIA CODIFICANTE DA MOLÉCULA CD28 DE LINFÓCITO DE <i>Gallus gallus</i>	27
FIGURA 5 - MAPA DO VETOR pcDNA 3.1 (-)	37
FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO INSERTO GERADO A PARTIR DO ALINHAMENTO DOS INICIADORES NUCLEOTÍDEOS P3 E P4.....	38
FIGURA 7- REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS IMUNIZADOS E DO PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS	54
FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE DILUIÇÃO LIMITANTE DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS.....	61
FIGURA 9- OBTENÇÃO DO INSERTO PARA CLONAGEM DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28.....	65
FIGURA 10- PCR DE COLÔNIA COM BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO PET28A(+)-CD28.....	66
FIGURA 11- TESTE DE DIGESTÃO DE PLASMÍDEOS PURIFICADOS A PARTIR DE QUATRO COLÔNIAS DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO PET28A(+)-CD28	67
FIGURA 12- SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA 21 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO pET28a(+)-CD28	69
FIGURA 13- PCR DE COLÔNIA COM BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His	71
FIGURA 14- SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA 8 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His	72
FIGURA 15- OBTENÇÃO DO INSERTO PARA CLONAGEM DA GLICOPROTEÍNA CD28	73
FIGURA 16- PCR DE COLÔNIA COM BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His-CD28.....	74

FIGURA 17- SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA 5 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His-CD28.....	76
FIGURA 18- EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 EM QUATRO COLÔNIAS DIFERENTES DE <i>E. coli</i>	77
FIGURA 19- ANÁLISE DO LISADO DE CÉLULAS BACTERIANAS EXPRESSANDO A PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28.....	78
FIGURA 20- ANÁLISE DA SOLUBILIZAÇÃO COM AGENTE CAOTRÓPICO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 EXPRESSA EM BACTÉRIAS	79
FIGURA 21- PURIFICAÇÃO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 EXPRESSO EM BACTÉRIAS.....	80
FIGURA 22- EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 EM CÉLULAS HUMANAS HEK293T.....	82
FIGURA 23- EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 EM CÉLULAS SÍMIAS COS-7	83
FIGURA 24- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE 12 CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM CD28 ATRAVÉS DE ELISA.....	84
FIGURA 25- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 POR ENSAIO DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	85
FIGURA 26- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 POR ENSAIO DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	86
FIGURA 27- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 POR CITOMETRIA DE FLUXO	88
FIGURA 28- VARREDURA DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS POR IMUNOENSAIO ELISA.....	90
FIGURA 29- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	91
FIGURA 30- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO	92
FIGURA 31- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	93
FIGURA 32- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO	94

FIGURA 33- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A SEU RECEPTOR ENDÓGENO EXPRESSO EM MACRÓFAGOS DE GALINHA	96
FIGURA 34- EXPRESSÃO DE MHC DE CLASSE II NOS MACRÓFAGOS PURIFICADOS PARA O ENSAIO DE LIGAÇÃO	97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES P1 E P2.....	28
QUADRO 2 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES P3 E P4.....	38
QUADRO 3 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES P5 E P6.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – células apresentadoras de antígenos

ATCC - American Type Culture Collection

BSA – Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumin)

BES - N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico

bp – Pares de base nitrogenada

CD – Cluster of differentiation

cDNA – DNA complementar

CTLA-4 – Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4)

Da – Dalton

DAPI – 4,6-Diamino-2-fenilindol

D.O. – Densidade óptica

DEPC – Dietil policarbonato

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

E. coli - *Escherichia coli*

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorescein Isothiocyanate)

HAT – Meio de cultivo celular contendo hipoxantina, aminopterina e timidina

HPRT - Hipoxantina Fosforribosil Transferase

HRP – Peroxidase de raiz-forte (Horseradish Peroxidase)

HT - Meio de cultivo celular contendo hipoxantina e timidina

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

IMAC – Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LPS – Lipopolissacarídeo

mAb – Anticorpo monoclonal (Monoclonal Antibody)

Meio LB - Meio Luria-Bertani

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)

mRNA – RNA mensageiro

NCBI – Centro Nacional de Informações de Biotecnologia (National Center for Biotechnology Information)

Ni – Níquel

NTA – Ácido Nitrilotriacético

Pa – Pascal (N/m^2)

pb – Pares de bases nitrogenadas

PBMC – Célula mononuclear de sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS – Tampão salina fosfato (Phosphate Buffer Saline)

PBST – Tampão salino fosfato adicionado de Tween-20

PCR – Reação de cadeia da polimerase

PEG – Polietilenoglicol

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA – Ácido Ribonucléico

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TCR – Receptor de células T

TLR – Receptor Toll-like

TBST – Tampão salino Tris adicionado de Tween-20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 A PROTEÍNA CD28	19
2.2 SISTEMA IMUNE DE AVES.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM.....	25
3.2 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULA BACTERIANA	25
3.2.1 Escolha dos vetores de expressão.....	25
3.2.2 Desenho dos iniciadores para clonagem de CD28 em pET28a(+).....	27
3.2.3 Obtenção de cDNA	28
3.2.4 Obtenção do Inserto para clonagem da porção extracelular de CD28	29
3.2.5 Reação de digestão do inserto obtido e do pET28a(+)	30
3.2.6 Reação de ligação do inserto e do pET28a(+) digeridos.....	32
3.2.7 Transformação em bactérias <i>E. coli</i> DH5 α	33
3.2.8 PCR de colônia	33
3.2.9.Purificação plasmidial em pequena escala (mini-prep) de pET28a(+) com inserto CD28	34
3.2.10 Teste de digestão do pET28a(+) com inserto CD28	34
3.2.11 Reação de sequenciamento de nucleotídeos.....	35
3.3 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA GLICOPROTEÍNA CD28 PARA EXPRESSÃO EM CÉLULA DE MAMÍFERO	36
3.3.1 Escolha dos vetores de expressão.....	36
3.3.2 Modificação do pcDNA3.1(-)	39
3.3.2.1 Digestão do pcDNA3.1(-)	39
3.3.2.2 Reação de ligação do pcDNA3.1(-) digerido com <i>Acc65I</i> e <i>BamHI</i>	39
3.3.2.3 PCR de colônia	40
3.3.2.4 Reação de sequenciamento de nucleotídeos.....	41
3.3.3 Desenho dos iniciadores para clonagem de CD28 em pcDNA3.1(-).....	41

3.3.4 Obtenção de cDNA	42
3.3.5 Obtenção do Inserto para clonagem da glicoproteína CD28.....	42
3.3.6 Reação de digestão do inserto obtido e do pcDNA 3.1(-)6His	43
3.3.7 Reação de ligação do inserto e do pcDNA3.1(-)6His digeridos.....	43
3.3.8 Transformação em bactérias <i>E. coli</i> DH5α	44
3.3.9 PCR de colônia	44
3.3.10 Purificação plasmidial em pequena escala (mini-prep) de pcDNA3.1(-) com inserto CD28	45
3.3.11 Reação de sequenciamento de nucleotídeos.....	45
3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pET28a(+)	46
3.4.1 Expressão da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+)	46
3.4.1.1 Expressão em pequena escala da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+)	46
3.4.1.2 Expressão em larga escala da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+).....	47
3.4.2 Purificação da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+)	48
3.4.3 Confirmação da proteína expressa e purificada usando ensaio de <i>Western</i> <i>Blotting</i>	48
3.5 EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)	49
3.5.1 Expressão da glicoproteína CD28 em células HEK293T	50
3.5.2 Expressão da glicoproteína CD28 em COS-7	51
3.6.PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAIS CONTRA CD28 DE LINFÓCITOS DE AVES	53
3.6.1 Imunização de camundongos Balb/c e Swiss	53
3.6.2 Análise da resposta humoral frente ao antígeno CD28.....	55
3.6.2.1 Análise da obtenção de anticorpos policlonais por ELISA.....	55
3.6.2.2 Análise dos anticorpos policlonais por <i>Western blotting</i>	56
3.6.2.3 Análise dos anticorpos policlonais por Citometria de Fluxo.....	56
3.6.3 Obtenção de hibridomas secretores de anticorpos	57

3.6.3.1 Fusão de células miéloides e esplenócitos de camundongos imunizados contra CD28	57
3.6.3.2 Manutenção dos hibridomas	59
3.6.3.3 Varredura dos hibridomas	59
4 RESULTADOS.....	65
4.1 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULA BACTERIANA.....	65
4.2 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE CD28 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULA DE MAMÍFERO	70
4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pET28a(+)	77
4.4 EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His	81
4.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA CD28 DE LINFÓCITOS DE AVES	84
4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA CD28 DE LINFÓCITOS DE AVES	89
4.7 ENSAIO DE LIGAÇÃO DE CD28 RECOMBINANTE COM MACRÓFAGOS DE GALINHA.....	95
5 DISCUSSÃO	98
5.1 CLONAGEM DE CD28.....	98
5.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE CD28	99
5.3 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A CD28	102
5.4 ENSAIO DE LIGAÇÃO DE CD28 RECOMBINANTE COM MACRÓFAGOS DE GALINHA.....	103
6 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

CD28 é uma glicoproteína expressa na superfície de linfócitos T, e sua função está relacionada com a ativação dos linfócitos T. Esse processo ocorre quando há interação entre CD28 e seus ligantes, as moléculas CD80 e CD86, proteínas da família B7. Tanto CD80 quanto CD86 são expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos profissionais (APC), como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, células com um papel central no desenvolvimento da resposta imune.

Em aves já se sabe que há tanto a expressão de CD28 quanto de seus ligantes, e que ambos são capazes de interagir entre si e originar uma ativação dos linfócitos T, como ocorre em mamíferos. Apesar de algumas semelhanças com o sistema imune de mamíferos, as aves diferem em vários aspectos imunológicos, tanto anatômica quanto fisiologicamente. Portanto, são necessários estudos voltados especificamente para as aves, uma vez que extrapolar conhecimentos de um modelo animal para outro pode não ser confiável.

Considerando-se que a cada ano são criadas 50 bilhões de galinhas no mundo, sendo que o Brasil contribui bastante com esse número, faz-se necessário o conhecimento dos mecanismos imunológicos desses animais, visando a proteção do plantel contra agentes patogênicos. Atualmente estudos estão sendo feitos acerca da avaliação imune das aves, de modo que a obtenção de ferramentas que auxiliem nessa avaliação são bem vindas.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é de se obter hibridomas secretores de anticorpos monoclonais que reconheçam a glicoproteína CD28 de linfócitos de galinha.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto incluem:

- Clonar a porção extracelular de CD28 de linfócitos de galinha em vetor de expressão procarionte;
- Clonar a sequência codificante de toda a glicoproteína CD28 de linfócitos de galinha em vetor de expressão eucarionte;
- Expressar a proteína em sistema heterólogo procarioto e eucarioto;
- Purificar a proteína recombinante;
- Produzir anticorpos policlonais contra o CD28 de galinha a partir de imunização de camundongos;
- Produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais que reconheçam a proteína de interesse a partir da fusão de esplenócitos de camundongo com células de mieloma;
- Caracterizar os anticorpos monoclonais obtidos por imunoensaios como ELISA, *western blotting*, imunifluorescência e imunoprecipitação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A PROTEÍNA CD28

As moléculas CD, do inglês *cluster of differentiation*, são marcadores de linfócitos expressos nas membranas celulares em estágios específicos do desenvolvimento celular. Já foram descritas mais de 300 dessas moléculas, que incluem receptores de antígenos, de glicoproteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de moléculas adesivas, de imunoglobulinas, do sistema complemento, de linfocinas e outros fatores de diferenciação e crescimento (FÁBRYOVÁ et al., 2009).

Entre essa diversidade de moléculas CD, encontra-se o CD28. Essa molécula é uma glicoproteína transmembrana, da superfamília das imunoglobulinas, com uma estrutura que engloba um peptídeo sinal, uma porção extracelular altamente glicosilada, uma região hidrofóbica transmembrana e uma porção citoplasmática, formando uma proteína de 40 kDa (figura 1). O CD28 é encontrado em células T, e é essencial na ativação desse tipo celular, sendo que sua estrutura está relacionada com sua função. Essa ativação é sinalizada pela ligação de moléculas específicas ao CD28 pelo seu domínio extracelular, que então transmite um sinal à célula T pela sua porção intracelular. Todo esse processo sinaliza um aumento na transcrição de várias citocinas, que acabam por ativar o linfócito T (ARSTILA *et al.*, 1994; MALEK *et al.*, 2004; POWELL *et al.*, 2009)

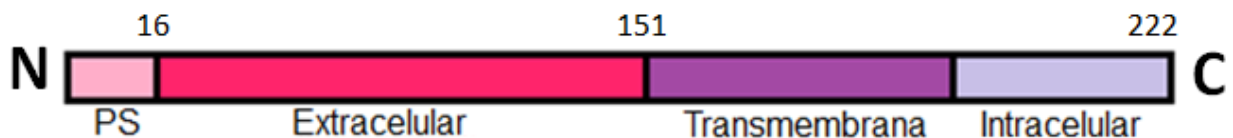


FIGURA 1- ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA GLICOPROTEÍNA CD28
FONTE: O autor (2012).

Tanto a proteína CD28 quanto o receptor de antígeno de célula T (TCR) estão co-localizados na região central da sinapse imunológica, uma estrutura transiente

formada quando as membranas plasmáticas de duas células do sistema imune se aproximam de modo a promover alguma sinalização entre si (BOUR-JORDAN *et al.* 2012; ALARCÓN *et al.*, 2011).

A ativação de células T envolve um modelo que propõe duas sinalizações para que esse evento ocorra: o sinal 1 e o sinal 2, indicados na figura 2. O primeiro sinal é passado pela ligação do TCR com o complexo CD3 e o antígeno associado a moléculas MHC. O segundo sinal é passado através de moléculas co-estimulatórias presentes nas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, capazes de induzir a produção de citocinas específicas que modulam a ativação celular. Nesse contexto, encaixa-se a glicoproteína CD28, uma molécula acessória capaz de prover o sinal 2 à célula T, pois atua como receptor de moléculas presentes na superfície das APCs, as proteínas CD80 e CD86 (proteínas da família B7), cuja interação com CD28 sinaliza para o TCR que haja um aumento na produção de citocinas, principalmente a IL-2. Quando uma célula apresentadora de antígenos que não expressa B7, ou seja, uma APC não profissional expõe o antígeno ao linfócito T, este entra em um estado de anergia, não havendo sua ativação (SCHWARTZ, 1992).

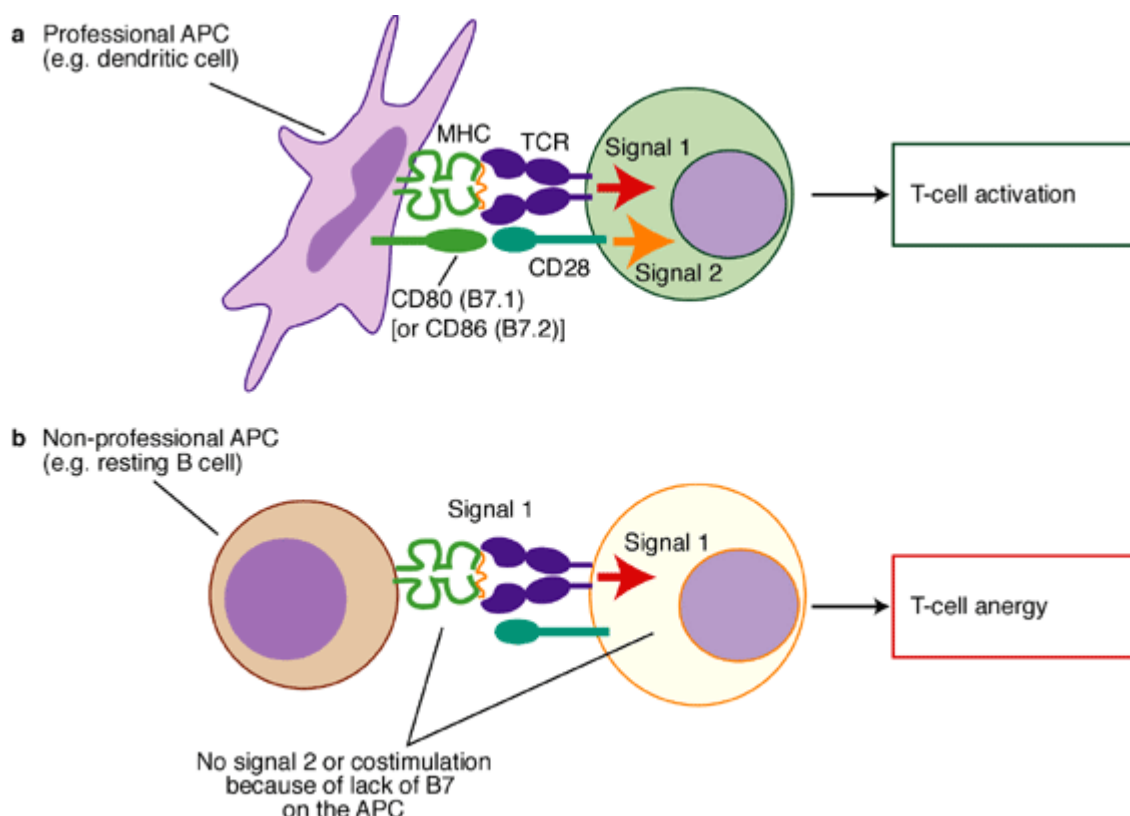


FIGURA 2 - MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T POR CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

FONTE: Adaptado de Harber et al, 2000.

NOTA: Ativação dos linfócitos T é mediada pela interação da glicoproteína CD28 com moléculas acessórias CD80 e CD86.

São conhecidos sete membros da família B7: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), PD-L1, PD-L2, B7-H3 e B7-H4. Sabe-se que CD28 e CTLA-4 são receptores de CD80 e CD86, sendo que a interação com CD28 é imunoestimuladora e com CTLA-4 imunoinibidora. A molécula ICOS é o receptor de ICOS-L e PD-1 é receptor tanto de PD-L1 quanto PD-L2; os receptores de B7-H4 e B7-H3 ainda são desconhecidos (COLLINS *et al.*, 2005; FAUCI *et al.*, 2012).

O CTLA-4, o antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico, é um membro da superfamília das imunoglobulinas com uma similaridade de 32% com o CD28. Apesar de também ser capaz de se ligar ao CD80/CD86, até mesmo com maior afinidade do que o CD28, o CTLA-4 atua como um regulador negativo da ativação do linfócito T, controlando o nível da resposta imune. Essa proteína tem expressão apenas em linfócito ativado, enquanto o CD28 pode ser encontrado em ambos (PARSONS *et al.*, 1996; WONG *et al.*, 2005).

Mesmo sendo capazes de se ligar aos mesmos receptores, CD80 e CD86 possuem apenas 25% de identidade de aminoácidos entre si. Ambos são membros da superfamília das imunoglobulinas, possuindo domínio extracelular IgC e IgV, sendo este responsável pela ligação com os seus receptores (COLLINS *et al.*, 2005). Sabe-se que a ligação tanto de CD28 quanto de CTLA-4 a CD80/CD86 é mediada pelo hexapeptídeo MYPPPY, uma sequência de aminoácidos altamente conservada entre ambos os receptores de diversas espécies; já foi descrito, entretanto, que em CD28 de gado a metionina do hexapeptídeo é substituída por leucina, não alterando a capacidade de ligação do CD28 a CD86 (COLLINS *et al.*, 2005; PARSONS *et al.*, 1996).

Em 2004, foi descrito que, em mamíferos, CD28 é capaz de passar um sinal imunoestimulatório para células apresentadoras de antígenos, mais especificamente células dendríticas, via CD80 e CD86. A interação entre proteínas B7 com o CD28 induz um aumento de expressão de IL-6 e IFN- γ em células dendríticas, tornando essa interação uma via de duas mãos, na qual ambas as células são estimuladas (ORABONA *et al.*, 2004). Entretanto, não se sabe se esse mecanismo também ocorre em células de aves, pois nenhum trabalho foi feito nessa área.

Na última década, progressos na compreensão do mecanismo de ativação das células T têm gerado novas estratégias para o tratamento de doenças imunológicas (POWELL *et al.*, 2009; WARD, 1996), onde se encaixa a importância dos estudos acerca da molécula CD28. No entanto, pouco se sabe sobre células apresentadoras de antígenos profissionais em galinhas, tendo sido descoberta uma molécula homóloga ao CD80 de mamífero nesses animais apenas em 1999 (O'REGAN *et al.*, 1999), embora a presença de CD28 em galinhas ser conhecida desde 1994 (YOUNG *et al.*, 1994). Alguns estudos já demonstraram que em galinhas o CD28 é encontrado na maioria das células T $\alpha\beta$, sendo capaz de passar o sinal co-estimulatório, ou segundo sinal, já extensivamente descrito em mamíferos (ARSTILA *et al.*, 1994).

2.2 SISTEMA IMUNE DE AVES

Estimativas apontam que a cada ano cerca de 50 bilhões de galinhas são criadas (KAISER, 2010), sendo que o Brasil abateu em 2011 5,3 bilhões de animais, e só no primeiro trimestre desse ano já foram abatidas 1,363 bilhão de frangos. Ainda no primeiro trimestre de 2012, com 58,8% do abate nacional feito nos estados da região Sul (IBGE, 2012). Tendo em vista a grande quantidade de animais sendo criados e abatidos, faz-se necessário o uso de ferramentas que permitam proteção dos animais ao intenso manejo realizado, aumentando a produtividade.

A avicultura é uma fonte significativa de zoonoses, como a influenza aviária, *Salmonella* e *Campylobacter*, e a capacidade de desenvolver respostas imunes desses animais é importante na manutenção da sua performance frente a desafios ambientais (KAISER, 2010; YE *et al.*, 2006). Além disso, é necessário que a carne produzida esteja livre de organismos patogênicos, pois estes podem causar danos a saúde humana, como é o caso da *Salmonella*.

Algumas medidas são tomadas com intuito de proteger o plantel, como o uso de antibióticos e outras drogas. No entanto, o uso destas drogas é cada vez mais questionado, devido a seleção de bactérias resistentes às drogas como à presença de resíduos dos medicamentos na carne dos animais. Desse modo, é de grande importância a utilização de métodos alternativos no controle das infecções, como vacinações e criação de aves resistentes as infecções. Além disso, faz-se necessário desenvolver o conhecimento acerca dos mecanismos de virulência de patógenos bem como os mecanismos de defesa do hospedeiro, para que possam ser manipulados em prol do plantel (KAISER, 2010; MALEK *et al.*, 2004).

A resistência a infecções é determinada tanto pela imunocompetência genética como por fatores ambientais. Um exemplo do fator genético é o polimorfismo no *loci* do MHC, sabidamente associado a resistência ou susceptibilidade das aves a doenças, que está diminuído em aves criadas comercialmente. Essas aves, que estão sob intensa vacinação e seleção genética aparentam-se saudáveis, mas pouco se sabe sobre seu estado imunológico (BRIDLE *et al.*, 2006; KAISER, 2010).

Apesar de possuírem semelhanças em seus princípios básicos, sabe-se que o sistema imune de aves difere do sistema imune de mamíferos. Por exemplo,

galinhas possuem diferentes repertórios de receptores Toll-like (TLR) e quimiocinas; não possuem linfonodos, porém há a Bursa de Fabricius que funciona como um órgão linfoide primário; não apresentam plaquetas, mas seus análogos funcionais, os trombócitos; não apresentam eosinófilos funcionais, entre outras diferenças tanto no que diz respeito a moléculas e genes como a células, órgãos e mecanismos biológicos que envolvem todas essas estruturas (KAISER, 2010; WU *et al.*, 2011).

A avaliação da imunocompetência pode ser feita pelo uso de biomarcadores, como as populações de linfócitos do sangue periférico, que estão sob controle genético. Isso pode ser feito baseando-se no fato de que classes de linfócitos funcionalmente distintas expressam diferentes tipos e proteínas em sua superfície. Essa avaliação, portanto, pode ser feita através da marcação de proteínas específicas de cada população por anticorpos conjugados a fluoróforos e detectados por citometria de fluxo. Combinações de diferentes anticorpos podem ser usadas para discriminar as populações de diferentes leucócitos, cada qual com funções diversas no sistema imune (BRIDLE *et al.*, 2006; KAISER, 2010; BEIRÃO, 2011).

Alguns parâmetros, no entanto, devem ser tomados com cuidado pois podem sofrer variações com a idade do animal avaliado, que é o caso do CD28, cujos níveis de expressão aumentam com a idade, atingindo um platô no estágio juvenil II e idades adultas (BEIRÃO, 2011).

Propõe-se que linfócitos T CD8⁺ apresentem CD28 em suas superfícies quando virgens ou células de memória, mas perdem a expressão ao se tornarem efetores (NABESHIMA *et al.*, 2002). Além disso, linfócitos T CD8 α ⁺CD28⁻ possuem uma modulação consistente com o curso da infecção com diferentes microrganismos, indicando ativação das células após contato com o patógeno, muito provavelmente devido a apresentação de antígenos aos linfócitos T por APCs, tornando-se um bom marcador na avaliação do perfil imune de animais (BEIRÃO, 2011).

Sabendo-se do limitado conhecimento acerca de alguns mecanismos imunológicos de galinhas, bem como da importância da avaliação imune de aves em sua criação, recentemente muitos estudos estão sendo desenvolvidos com CD28 e suas funções no sistema imune aviário. Considerando-se a importância do estudo do CD28, bem como de sua aplicação em diagnósticos com relevância comercial, a produção de uma ferramenta, como o anticorpo monoclonal, que atenda a essas demandas é de grande interesse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM

Com base na sequência de aminoácidos do CD28 de *Gallus gallus* e de *Mus musculus*, observa-se uma identidade de 50% entre as proteínas homólogas, o que permite um bom potencial imunogênico da molécula de galinha frente ao camundongo.

Para a clonagem, duas abordagens diferentes foram estabelecidas: clonagem da molécula inteira do CD28, juntamente com o peptídeo sinal, para expressão em organismo eucarioto, no caso células de rim de embrião humano (HEK293T) e clonagem da porção extracelular do CD28 para expressão em *Escherichia coli*. Foram escolhidas essas diferentes abordagens, tendo em vista que o sistema de expressão em *E. coli* permite a obtenção da proteína facilmente e em grande quantidade, entretanto por não realizar modificações pós-traducionais optou-se também pela expressão em célula de mamífero, capaz de realizar tais modificações, uma vez que a porção extracelular do CD28 possui sete sítios de glicosilação do tipo N-ligada.

3.2 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULA BACTERIANA

3.2.1 Escolha dos vetores de expressão

Para a expressão em *E. coli*, foi usado o vetor pET28a(+) (Novagen). Esse vetor possui em seu sítio de policlonagem uma sequência que codifica para seis aminoácidos histidinas sequenciais (figura 3), podendo ficar tanto na porção N-

terminal quanto C- terminal em relação ao inserto a ser clonado no sítio, o que facilita verificar a expressão do produto de interesse, bem como sua purificação.

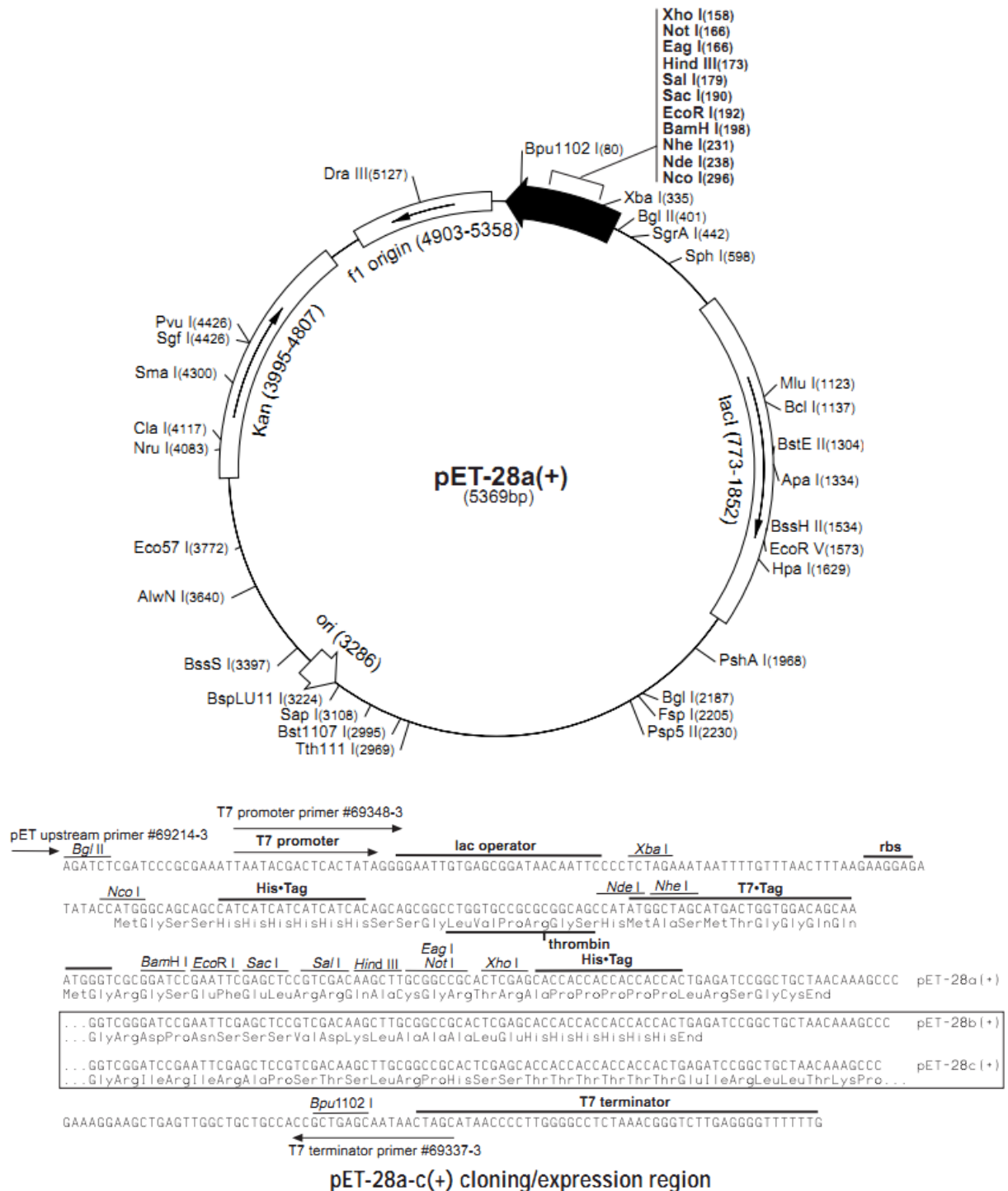


FIGURA 3 - MAPA DO VETOR pET28a(+)

FONTE: Novagen.

Para a clonagem deste trabalho, optou-se pela expressão N-terminal da cauda de histidina, que em geral beneficia a solubilidade de molécula a ser expressa.

3.2.2 Desenho dos iniciadores para clonagem de CD28 em pET28a(+)

A sequência de RNA mensageiro (mRNA) usada para o desenho dos iniciadores foi a do gene para a molécula CD28 de *Gallus gallus* (NM_205311.1 do banco de dados do NCBI) indicada na figura 4, considerando-se o uso do vetor para expressão pET28a(+) (Novagen).

```

1 GAAGCCCTGG GGGGCTCGGC AGTGCCTGGA CGGTGGGCAC AAGGCCGCAG GCCCACCATC
61 GTCACCATGC TGGGGATCCT CGTGGTGCTC TGCCTCATCC CTGCTGCAGA TGTAACAGAA
121 AACAAAGATTC TAGTGGCTCA GCGTCCTTTG CTCATTGTAG CCAACAGAAC AGCAACTCTA
181 GTCTGCAACT ACACATACAA TGGAAACAGGG AAAGAATTTG GAGCCTCGCT GCACAAAGGA
241 ACAGACAGTG CAGTCGAAGT CTGCTTTATT TCATGGAACA TGACCAAAAT TAACAGTAAT
301 TCAAATAAGG AATTCAACTG TCGGGGGATT CATGATAAGG ACAAAGTAAT CTTCAATCTT
361 TGGGAATATGA GTGCCAGCCA AACTGACATC TACTTCTGCA AAATCGAGGC CATGTATCCA
421 CCTCCATATG TCTATAATGA GAAGAGCAAT GGGACTGTCA TTCATGTCAG AGAGACACCC
481 ATCCAAACAC AAGAACCTGA ATCTGCAACT TCTTACTGGG TCATGGTGGC AGTGACGGGA
541 CTTCTTGGTT TCTACAGTAT GCTTATAACT GCAGTCTTTA TAATCTACCG GCAAAAATCC
601 AAGAGGAACA GGTACCGTCA GAGTGACTAC ATGAATATGA CCCCCCGGCA TCCACCTCAC
661 CAGAAGAACA AGGGCTACCC ATCCTATGCA CCAACACGAG ACTACACTGC ATATCGCTCC
721 TGGCAGCCAT GATACCCAGC AGCCGAACAC CACTATCCTG GTGTGCTTCT AGGCAGTCAC
781 CTGCTCTTGG AATGGAAGGA CAGCCTGTCA TTTCCTCACT GTGTTTGTTA CTATTGACCA
841 TGGAT

```

FIGURA 4 - SEQUÊNCIA do mRNA DA MOLÉCULA CD28 DE LINFÓCITO DE *Gallus gallus*

FONTE: National Center for Biotechnology Information (NCBI).

NOTA: Sequência de RNA mensageiro que codifica para a molécula CD28 de *Gallus gallus*. A sequência codificante (CDS) encontra-se marcada em amarelo.

Com auxílio de programas de bioinformática como o NEBcutter V2.0, foram determinadas as enzimas de restrição usadas, com base no fato de possuírem sítios na região de policlonagem do vetor, mas que não digerissem a sequência alvo.

Para verificar se os iniciadores estavam adequados, eles foram testados quanto diversas características da sequência. Uma delas é a temperatura de *melting*, temperatura na qual metade das bases em determinada sequência encontra-se desnaturada, devendo essa temperatura ser muito próxima tanto para o

iniciador *forward* quanto o reverso, uma vez que são usados juntos em reações baseadas em gradientes de temperatura. Além disso, analisou-se a formação de estrutura de grampo na sequência, que pode ser formada por interações entre as bases de sua própria fita, atrapalhando a obtenção de insertos quando formadas. Homodímeros, dímeros formados entre duas moléculas do mesmo iniciador, e heterodímeros, dímeros formados entre os iniciadores *forward* e reverso, também são analisadas, pois a intenção não é a de que os iniciadores se anelem, e sim que flanqueiem a região da sequência de nucleotídeos de interesse para reações de PCR. A sequência dos iniciadores desenhados encontra-se no quadro 1

Primer Forward (P1)	5'-CCTTTCAGCTAGCGTAACAGAAAACAAGATTCT-3'
Primer Reverso (P2)	5'-TGCCTCGAGTTACCAGTAAGAAGTTGCAG-3'

QUADRO 1 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES P1 E P2

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sequência dos iniciadores desenhados pra clonagem da porção extracelular de CD28 de linfócitos de galinha.

Após o desenho desses iniciadores, foi usado o BLAST para confirmar a especificidade do alinhamento dos iniciadores com a sequência e posição desejadas, verificando que de fato os iniciadores se alinhavam apenas na posição prevista, para que não houvesse risco de amplificação de outras sequências do cDNA que não a da porção extracelular do CD28.

3.2.3 Obtenção de cDNA

A clonagem da sequência que codifica para a porção extracelular do CD28 em plasmídeo foi precedida pela obtenção de tal sequência, que por sua vez depende diretamente da obtenção de cDNA referente ao mRNA no qual se baseou a estratégia de clonagem. Para se obter o cDNA, foi realizada uma reação de transcriptase reversa a partir de RNA extraído de linfócitos de galinha.

Para extração do RNA, os linfócitos foram purificados a partir do sangue total de galinhas com anticoagulante, utilizando-se uma metodologia de centrifugação com gradiente de densidade baseado em Ficoll-Histopaque®-1077 (Sigma). Após lavagens com tampão salino PBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2.7 mM, pH 7.4) para remover o soro e restos de histopaque, o RNA total foi extraído usando-se o método do TRIzol (Invitrogen) seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante.

Obtido o RNA, empregou-se a reação de transcriptase reversa para se obter o cDNA correspondente. A reação de transcriptase reversa foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, são misturados 20 pmol de iniciadores, no caso o oligodT, 500 ng de RNA total e água ultrapura completando 5 µL de volume reacional. Para ideal funcionamento da enzima responsável pela transcrição reversa de mRNA, foi feito aquecimento em termociclador (Bio-Rad MyCycler) a 70 °C por 5 min e então um rápido resfriamento para 4 °C, numa tentativa de eliminar estruturas secundárias do mRNA. Na segunda etapa, foram adicionados 20 µL de uma solução contendo tampão ótimo para a atividade da enzima (50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 10mM DTT, pH 8.3 a 25 °C), 3,75 mM MgCl₂, 0,625 mM dNTPs, 1,25 U/20 µL RNase Out, 1 µL de transcriptase reversa *Improm II Reverse transcriptase* e água, sendo todos os reagentes da marca Promega. Novamente foi feito aquecimento em termociclador a 25 °C por 5 minutos para anelamento dos iniciadores, seguido por aquecimento a 42 °C por 60 minutos para extensão das fitas de cDNA e 72 °C por 15 minutos para inativação da enzima.

É importante salientar que as reações que envolvem RNA foram realizadas em tubos específicos para PCR, pré-tratados por 16 horas com DEPC (Invitrogen) e posteriormente autoclavados, para eliminar quaisquer resíduos de RNases ou outras moléculas que interfiram na reação; além disso, a água utilizada também previamente tratada com DEPC 0,01% e autoclavada.

3.2.4 Obtenção do inserto para clonagem da porção extracelular de CD28

Os insertos foram obtidos por reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir dos iniciadores desenvolvidos e do cDNA obtido.

Inicialmente realizaram-se reações testes de PCR utilizando *Taq* DNA Polimerase para padronizar as condições de reação e verificar a especificidade dos iniciadores. Após os testes, foram realizadas reações utilizando enzima *Pfu* DNA Polimerase para a amplificação de produtos, visando à clonagem com uma taxa de erros mais baixa. Essa menor taxa de erros está relacionada com a atividade exonucleásica 3'→5' dessa enzima.

Na reação, foram usados 2,5 µL de tampão para *Pfu* DNA polimerase 10 vezes concentrado, MgSO₄ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, *Pfu* DNA polimerase 2,5 U/µL, 0,5 µM de cada iniciador (forward e reverso), com todos os reagentes citados da marca Promega, 5% de dimetilsufóxido (Amresco), 500 ng de cDNA e água ultrapura completando 25 µL de volume reacional. A reação foi incubada a 95 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95°C por 40 segundos, 60,5 °C por 45 segundos, 72 °C por 30 segundos e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, todas as etapas em termociclador (BioRad MyCycler). O uso de *hot start* a 95 °C foi usado com a finalidade de aumentar a especificidade e rendimento da reação, uma vez que as reações de amplificação são iniciadas a temperaturas elevadas, sem sofrer a rampa de elevação de temperatura.

A reação foi então analisada em gel de agarose 1% em TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) juntamente com 0,5 µg do marcador de pares de base 100 bp e Lambda *Hind*III ladder (Fermentas), com o resultado visualizado sob luz Ultravioleta. Essa mesma análise em gel de agarose foi feita nas etapas a seguir.

3.2.5 Reação de digestão do inserto obtido e do pET28a(+)

A inserção do inserto obtido no plasmídeo foi feita através das enzimas de restrição. Para isso, os produtos de PCR obtidos com os pares de iniciadores foram purificados do gel de agarose por gel-extração usando-se kit comercial da QIAGEN (QIAquick Gel *Extraction Kit*). A eluição do inserto foi feita com 40 µL de água ultrapura.

A reação de digestão do inserto e do plasmídeo foi feita em duas etapas, uma para cada enzima de restrição, no caso a *XhoI* e a *NheI*. Como a gel extração leva a muita perda de material, decidiu-se não gel extrair o inserto digerido pela *XhoI* para então digeri-lo com a *NheI*, mas sim modificar o tampão de reação da *XhoI* para usar a *NheI* direto. Para verificar a eficiência da digestão da primeira enzima, foi feita uma reação teste com o plasmídeo nos mesmos parâmetros para que fosse analisada em gel de agarose. Como a *XhoI* é da Fermentas e usa o tampão “Orange”, e a *NheI* é da New England Biolabs e usa o tampão “NEBuffer 2”, analisou-se a composição de ambos para verificar como modificar um deles para usar a outra enzima.

Com base na comparação dos tampões, decidiu-se usar primeiro a enzima *XhoI*. Primeiramente, o produto da PCR gel-extraído foi incubado com 5 µL de tampão “Orange” concentrado 10 vezes (Fermentas), 10 U da enzima de restrição *XhoI* (Fermentas) e água ultrapura completando para um volume reacional de 50 µL. Paralelamente, repetiu-se a mesma digestão com o plasmídeo pET28a(+), usando 200 ng de material, para controle da reação. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas, e então a inativação da enzima a 80 °C por 20 minutos. A digestão teste foi então analisada em gel de agarose 1%.

Para modificar o tampão “Orange” de modo a ficar similar ao “NEBuffer 2”, adicionaram-se 25 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl₂ e 1 mM de DTT, todos livres de RNase e DNase. Somou-se a reação os 50 µL da reação anterior, 1U de *NheI*, e o volume reacional foi corrigido para 100 µL. Também nessa etapa, repetiu-se, paralelamente, a mesma digestão com o plasmídeo pET28a(+), usando 200 ng de material, para controle da reação. A digestão foi realizada a 37 °C por 4,5 horas, e então a inativação da enzima a 80 °C por 20 minutos. A digestão foi analisada em gel de agarose 1%.

A digestão do plasmídeo para ser usado na reação de ligação foi feita em duas etapas também, porém usando-se a gel extração entre cada uma. Portanto, a digestão do plasmídeo foi mais simples e direta que a do inserto. Cerca de 3 µg de plasmídeo pET28a(+) foram incubados com 2,5 µL de tampão “NEBuffer 2” concentrado 10 vezes (Fermentas), 10 U da enzima de restrição *NheI* (New England Biolabs) e água ultrapura completando para um volume reacional de 25 µL. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas, e então a inativação da enzima a 80 °C por 20 minutos. A digestão foi então analisada em gel de agarose 1%.

Como a digestão foi satisfatória, o produto digerido foi gel extraído com kit comercial (QIAGEN) em 30 μ L de água, e partiu-se para a segunda etapa da digestão. Para essa etapa, o volume da gel extração, 30 μ L, foi incubado com 8 μ L de tampão “Tango” 10 vezes concentrado (Fermentas), 10 U da enzima *Xho*I, e água ultrapura completando para um volume reacional de 40 μ L. A digestão foi realizada a 37 °C por 5 horas, e então a inativação da enzima a 80 °C por 20 minutos. A digestão foi então analisada em gel de agarose 1%. Como a digestão foi satisfatória, o produto digerido foi gel extraído com kit comercial (QIAGEN) em 30 μ L de água.

3.2.6 Reação de ligação do inserto e do pET28a(+) digeridos

O ensaio de ligação consiste na junção de plasmídeo e insertos já digeridos com o mesmo par de enzimas de restrição.

Para essa reação, usou-se uma fração molar entre plasmídeo e inserto digeridos de 1:5. Como foram usados 50 ng de pET28a(+) digerido, o que equivale a 0,014 pmol de produto, foi necessário 0,070 pmol de inserto digerido. Portanto, a reação foi feita usando-se 1 μ L de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 5 U de T4 DNA ligase recombinante (Fermentas), sendo essa enzima a responsável pela união de plasmídeo e inserto pela ligação fosfodiéster, 50 ng (0,014 pmol) de pET28a(+) digerido, 20 ng (0,070 pmol) de inserto digerido, e água ultrapura completando para um volume reacional de 10 μ L. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, seguida por inativação da enzima a 65 °C por 15 minutos. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo.

Obtido o vetor de expressão com seu inserto, foi feita a inserção desses produtos em bactérias.

3.2.7 Transformação em bactérias *E. coli* DH5 α

Após a reação de ligação foi feita a eletroporação dos plasmídeos em bactérias *E. coli* da estirpe DH5 α .

A transformação foi feita a partir de alíquotas de 40 μ L de bactérias eletrocompetentes, preparadas conforme descrito por Sambrook em 2001. A alíquota foi adicionada do produto de ligação, incubadas no gelo durante 1 minuto e submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV para a introdução do DNA na célula (eletroporador Bio-Rad). Após os pulsos elétricos, foi adicionado às células 1 mL de meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L) para recuperação celular durante uma hora a 37 °C sob agitação leve (SAMBROOK *et al* , 2001)

Após a recuperação das células, a cultura foi plaqueada em meio sólido LB-Ágar 15 g/L contendo 30 μ g/mL de canamicina (SAMBROOK *et al* , 2001) .

3.2.8 PCR de colônia

As colônias que conseguiram crescer em meio seletivo foram usadas para reação de PCR de colônia, na qual ao invés de se usar um molde de DNA para amplificar uma região determinada pelos iniciadores, utiliza-se a própria cultura bacteriana.

Essa reação foi feita coletando-se colônias de bactérias em palitos que foram então passados no fundo de microtubos próprios para reações de PCR. Cada amostra recebeu 1 μ L de tampão para Taq DNA Polimerase 10 vezes concentrado, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 0,5 μ M de iniciador *forward* P1, 0,5 μ M de iniciador *reverse* P2, 1 U/ μ L Taq DNA polimerase, DMSO 5%, e água ultrapura autoclavada completando para volume reacional de 10 μ L.

Os iniciadores usados e as condições da reação foram os mesmos usados na produção do inserto, exceto o primeiro aquecimento a 95 °C que durou 5 minutos, com o objetivo de garantir uma lise eficiente das bactérias presentes no tubo para

liberação do material genético no meio reacional. A reação foi analisada em gel de agarose 1%.

3.2.9. Purificação plasmidial em pequena escala (mini-prep) de pET28a(+) com inserto CD28

Algumas colônias selecionadas das bactérias DH5 α , que apresentaram resultado positivo no PCR de colônia, foram usadas para se fazer uma preparação plasmidial em pequena escala. Essa etapa foi necessária para se purificar o plasmídeo, de modo que se conheça sua concentração e seja possível usá-lo em demais análises.

Os clones recombinantes foram cultivados em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina a 30 μ g/mL durante 16 horas sob agitação constante a 37 °C. Esta cultura foi então centrifugada a 5400xg por 10 minutos a 4 °C e os plasmídeos recombinantes purificados com o sistema de mini preparação de plasmídeo QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação do plasmídeo obtido foi feita por análise de absorbância em 260 nm, verificando-se também a absorbância em 230 nm e 280 nm, que estão relacionadas com contaminação do plasmídeo por solventes orgânicos e proteínas, respectivamente. Essa análise foi realizada em equipamento específico, o nanodrop (Thermo Scientific).

3.2.10 Teste de digestão do pET28a(+) com inserto CD28

Os plasmídeos obtidos no item 3.2.9 foram analisados por teste de padrão de digestão para verificar a clonagem.

A reação de digestão foi feita em três análises: a primeira foi feita digerindo-se o plasmídeo com apenas uma das enzimas de restrição usadas para inserção do inserto no plasmídeo; a segunda foi feita digerindo-se o plasmídeo com apenas a

outra enzima de restrição usada para inserção do inserto no plasmídeo; e a terceira foi feita digerindo-se o plasmídeo com ambas as enzimas de restrição usadas para inserção do inserto no plasmídeo. Nesse momento optou-se por utilizar as enzimas *NcoI* (Fermentas) e *XhoI*.

Portanto, foram feitas três reações. A primeira reação foi feita usando 40 ng de plasmídeo purificado, 5 U da enzima *NcoI* (Fermentas), 5 µL do tampão “Tango” concentrado 10 vezes (Fermentas), e água ultrapura autoclavada completando para volume reacional de 25 µL. A segunda reação foi feita conforme a primeira, entretanto substituindo-se as 5 U de *NcoI* por 5 U de *XhoI*. A terceira reação foi feita usando 550 ng de plasmídeo purificado, 5 U da enzima *Nco* (Fermentas), 5 U de *XhoI* (Fermentas), 5 µL do tampão “Tango” concentrado 10 vezes (Fermentas), e água ultrapura autoclavada completando para volume reacional de 25 µL. Todas as reações foram realizadas a 37 °C por 16 horas, seguida por inativação das enzimas a 80 °C por 20 minutos. O resultado foi então analisado por gel de agarose 1%.

3.2.11 Reação de sequenciamento de nucleotídeos

A fim de se verificar o produto clonado no plasmídeo, foi feita uma reação de sequenciamento de nucleotídeos.

As reações de sequenciamento foram feitas com 1 µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 µL de tampão para sequenciamento 5 vezes concentrado, 5 pmol de iniciador P1 e 5 pmol de P2, 300 ng do plasmídeo a ser sequenciado, em um volume final de 10 µL. A reação foi realizada a 96 °C por 2 minutos e 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 51 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após a reação, as amostras foram precipitadas, adicionando-se 1 µL de solução de precipitação (Acetato de Sódio 1,5 M, EDTA 0,25 M) e 30 µL de etanol 100% (Merck), com incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação por 20 minutos a 20.000xg e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recebeu 15 µL de etanol 70% (Merck) gelado para lavagem e remoção de resíduos de sais. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados e o precipitado seco em estufa a 37 °C por uma hora. As reações foram mantidas em -20 °C até serem

aplicadas no sequenciador, cuja aplicação requer adição de 10 µL de formamida (HI-DI) logo antes da corrida.

Aqueles vetores que foram selecionados pelo sequenciamento, foram usados para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3) STAR (Invitrogen). Esta estirpe destina-se a superexpressão de proteínas, pois possui em seu genoma uma sequência que codifica para a DNA polimerase do fago T7 regulada pelo *operon lac*. Isso é muito importante, pois o pET28a(+) tem a expressão da proteína inserida no sítio de policlonagem regulada pelo promotor da T7 DNA polimerase. Portanto, através da inserção de molécula análoga a lactose (IPTG) foi possível induzir a expressão protéica do CD28.

3.3.CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA GLICOPROTEÍNA CD28 PARA EXPRESSÃO EM CÉLULA DE MAMÍFERO

3.3.1 Escolha dos vetores de expressão

Para a expressão da proteína recombinante em células de mamífero foi usado o vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen). Diferentemente do vetor pet28a, esse plasmídeo não possui cauda de histidinas em seu sítio de policlonagem (figura 5), e portanto decidiu-se inseri-la, uma vez que essa cauda auxilia na verificação da expressão proteica, já que há anticorpos disponíveis contra essa sequência de histidinas.

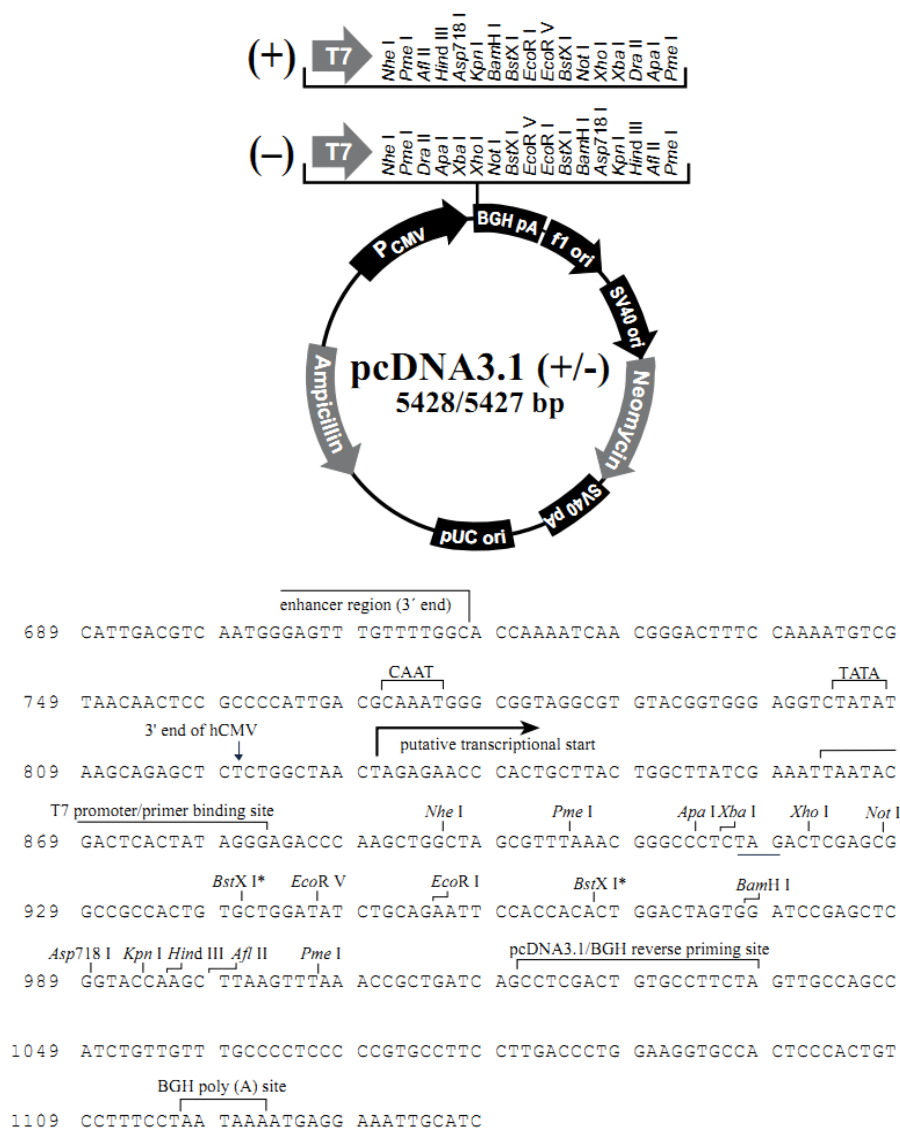


FIGURA 5 - MAPA DO VETOR pcDNA 3.1 (-)
FONTE: Invitrogen.

Para essa modificação o plasmídeo comercial pcDNA 3.1(-) foi digerido nos sítios das enzimas *Bam*HI e *Acc65*I, e foram desenhados iniciadores com sequência de nucleotídeos que codificam para seis aminoácidos histidina em tandem, complementares entre si na região terminal de um e inicial de outro, de modo que se anelem e se insiram na região entre os sítios da *Bam*HI e *Acc65*I, fechando o vetor com uma nova sequência em seu interior, além de um códon terminador logo após a

sequência de histidinas. Desse modo, a cauda de histidina se localizará na região C-terminal da proteína, não atrapalhando o processamento protéico através do envio da molécula ao retículo endoplasmático por meio do peptídeo sinal.

Esses iniciadores também foram testados assim como descrito no item 3.2.2. Entretanto, nesse caso era desejado a formação de heterodímeros de iniciadores para inserção da etiqueta de histidina no vetor comercial da Invitrogen, pois constitui a base da estratégia de modificação do plasmídeo. A sequência desses iniciadores encontra-se no quadro 2.

Iniciador Forward (P3)	5'-GATCCC ATCATCATCATCATCATTAG-3'
Iniciador Reverse (P4)	5'-GTACCTAATGATGATGATGATGATGG-3'

QUADRO 2 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES P3 E P4

FONTE: O autor (2012).

NOTE: Sequência dos iniciadores desenhados pra inserção da cauda de histidinas no plasmídeo pcDNA3.1(-).

Para facilitar o entendimento da estratégia de modificação do plasmídeo, a figura 6 representa um modelo esquemático do anelamento dos iniciadores. Vale ressaltar que o plasmídeo modificado contendo a cauda de histidina foi chamado de pcDNA3.1(-)6His.

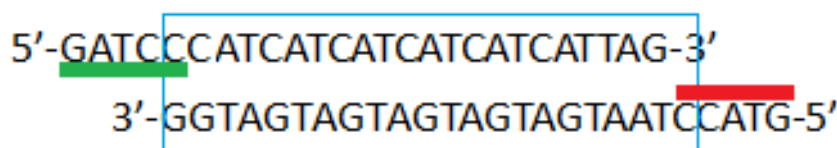


FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO INSERTO GERADO A PARTIR DO ALINHAMENTO DOS INICIADORES NUCLEOTÍDEOS P3 E P4

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Alinhamento dos iniciadores P3 e P4 pela região complementar entre ambos, região esta que codifica para as seis histidinas que gerarão a cauda desejada. Nas extremidades, sequência que mimetiza uma clivagem feita pela enzima *BamHI* (em verde) e *Acc65I* (em vermelho), capazes de se anelar com o plasmídeo digerido com estas mesmas enzimas.

3.3.2 Modificação do pcDNA3.1(-)

3.3.2.1 Digestão do pcDNA3.1(-)

Para a estratégia de inserção da cauda de histidina no pcDNA3.1(-), o plasmídeo foi digerido com as enzimas já descritas.

A digestão foi feita simultaneamente para as duas enzimas, com digestões teste feitas em paralelo. A digestão dupla foi feita incubando-se 3,5 µg de pcDNA3.1(-) com 10 µL de tampão “Tango” 10 vezes concentrado (Fermentas), 10 U da enzima *Acc65I* (Fermentas) e 10 U de *BamHI* (Fermentas) e água ultrapura completando para 50 µL de meio reacional. As reações simples foram feitas da mesma maneira, mas com apenas 400 ng de plasmídeo em volume reacional de 15 µL, usando apenas uma das enzimas. As reações foram incubadas a 37 °C por 16 horas e, sem inativação, analisadas direto em gel de agarose 1%. Verificada a adequada digestão, o produto duplamente digerido foi gel extraído usando-se kit comercial da QIAGEN.

3.3.2.2. Reação de ligação do pcDNA3.1(-) digerido com *Acc65I* e *BamHI*

Após a digestão e gel extração, o plasmídeo duplamente digerido foi ligado com o seu inserto. Como nessa etapa se deseja modificar o plasmídeo, inserindo uma cauda de seis histidinas no sítio de policlonagem, o inserto é o produto do anelamento dos iniciadores nucleotídeos P3 e P4, descritos anteriormente. Para gerar esse inserto, os iniciadores P3 e P4 foram incubados na proporção 1:1 e incubados a 75 °C por 30 minutos, e então deixados resfriar naturalmente, até entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente.

Para a reação de ligação, 50 ng de pcDNA3.1(-) digerido com as enzimas *Acc65I* e *BamHI* (0,014 pmol) foram incubados com 0,042 pmol do inserto (proporção plasmídeo:inserto de 1:3), 1 µL de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 5 U de T4 DNA ligase recombinante (Fermentas) e água

ultrapura completando para um volume reacional de 10 µL. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, sem inativação da enzima. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo.

Após as 16 horas de ligação, os produtos de ligação foram incubados com 20 µL de etanol 100% (Merck) por 10 minutos em gelo, e então centrifugados a 20000xg por 30 minutos a 4 °C. O sedimento foi seco e ressuspendido em 2 µL de água ultrapura, de modo a ser inserido em bactérias todo o material da reação de ligação. A eletroporação foi feita em *E. coli* DH5α, conforme descrito no item 4.2.7, usando meio seletivo com 200 µg/mL de ampicilina.

3.3.2.3 PCR de colônia

As colônias que conseguiram crescer em meio seletivo foram usadas para reação de PCR de colônia, conforme descrito no item 4.2.8, entretanto sem adição de DMSO. Para analisar essas colônias, foi usado o iniciador *forward* de sequenciamento do pcDNA3.1(-) e o iniciador P4 como reverso. Paralelamente, foram feitas duas reações: uma reação de controle positivo, e uma de controle negativo.

A reação de controle negativo foi feita usando todos os reagentes, mas sem amostra bacteriana, portanto sem molde de DNA. Já a reação de controle positivo, foi feita com amostra de bactéria eletroporada mas usando tanto o iniciador forward quanto o reverso de sequenciamento do sítio de policlonagem do pcDNA3.1(-).

A incubação das reações foi a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95 °C por 40 segundos, 44,5 °C por 45 segundos, 72 °C por 40 segundos e, após término dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, todas as etapas em termociclador (BioRad MyCycler). As reações foram então analisadas em gel de agarose 1%.

3.3.2.4 Reação de sequenciamento de nucleotídeos

Após a reação de PCR de colônia, é comum se fazer um teste de digestão nos plasmídeos antes de sequenciá-los. Entretanto, o inserto colocado no pcDNA3.1(-) é muito pequeno para ser detectado em gel de agarose ou poliacrilamida, uma vez que possui 21 pb. Desse modo, partiu-se para a reação de sequenciamento de nucleotídeos.

As reações de sequenciamento foram realizadas conforme descrito no item 3.2.11, após purificação do plasmídeo como descrito no item 3.2.9. A diferença foram os iniciadores, específicos para sequenciar o pcDNA3.1(-), e as condições utilizadas, que foram de 96 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 44,5 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após a reação, as amostras foram precipitadas, como descrito anteriormente, e mantidas a -20 °C até serem aplicadas no sequenciador com formamida.

3.3.3 Desenho dos iniciadores para clonagem de CD28 em pcDNA3.1(-)

A sequência usada para o desenho dos iniciadores foi a mesma descrita no item 3.2.2, considerando-se o uso do vetor para expressão pcDNA3.1(-)6His (Invitrogen, modificado pelo autor).

Conforme descrito anteriormente, foram usadas enzimas de restrição que apresentem sítios na região de policlonagem do vetor, mas que não digiram a sequência alvo, no caso *BstXI* e *NheI*.

Da mesma forma como descrito no item 3.2.2, os iniciadores foram testados quanto diversas características da sequência, e tiveram sua especificidade de alinhamento com a sequência e posição desejadas verificada. A sequência dos iniciadores encontra-se no quadro 3.

Iniciador Forward (P5)	5'-TATTAGCTAGCGCCACCATGCTGGGGATC-3'
Iniciador Reverse (P6)	5'- CTGCCCAGTGTGGTGGCTGCCAGGAGCGA TATGCAG-3'

QUADRO 3 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES P5 E P6

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sequência dos iniciadores desenhados pra clonagem de toda a proteína CD28 de linfócitos de galinha.

3.3.4 Obtenção de cDNA

A obtenção de cDNA referente ao mRNA no qual se baseou a estratégia de clonagem foi feita conforme descrito no item 3.2.3.

3.3.5 Obtenção do Inseto para clonagem da glicoproteína CD28

Os insertos puderam ser obtidos por reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir dos iniciadores desenvolvidos e do cDNA obtido, conforme descrito no item 3.2.4.

Na reação, foram usados 2,5 µL de tampão para *Pfu* DNA polimerase 10 vezes concentrado, MgSO₄ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, *Pfu* DNA polimerase 2,5 U/µL, 0,5 µM de cada iniciador (P5 e P6), com todos os reagentes citados da marca Promega, 500 ng de cDNA e água ultrapura completando 25 µL de volume reacional. A reação foi incubada a 95 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95 °C por 40 segundos, 59,5 °C por 45 segundos, 72 °C por 1,4 minutos e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, todas as etapas em termociclador (BioRad MyCycler). O uso de *hot start* a 95 °C foi realizado com a finalidade de aumentar a especificidade e rendimento da reação. A reação foi então analisada em gel de agarose 1%.

3.3.6 Reação de digestão do inserto obtido e do pcDNA 3.1(-)6His

A digestão foi feita simultaneamente para as duas enzimas, com digestões simples teste feitas em paralelo, tanto para o plasmídeo quanto para o inserto. A digestão dupla foi feita incubando-se 20 µg de pcDNA3.1(-)6His com 2,5 µL de tampão “Tango” 10 vezes concentrado (Fermentas), 10 U da enzima *NheI* (Fermentas) e 10 U de *BstXI* (Fermentas) e água ultrapura completando para 25 µL de meio reacional. As reações simples foram feitas da mesma maneira, mas com apenas 1 µg de plasmídeo em volume reacional de 25 µL, usando apenas uma das enzimas.

A digestão do inserto foi feita da mesma forma, mas sem o plasmídeo e com todo o inserto gel extraído após a reação de PCR usado na digestão. As reações foram incubadas a 37 °C por 12 horas e 55 °C por 4 horas, com inativação a 65 °C por 20 minutos, analisadas direto em gel de agarose 1%.

Verificada a digestão adequada, o produto duplamente digerido foi gel extraído usando-se kit comercial da QIAGEN.

3.3.7 Reação de ligação do inserto e do pcDNA3.1(-)6His digeridos

Para a reação de ligação, 50 ng de pcDNA3.1(-)6his digerido com as enzimas *NheI* e *BstXI* (0,014 pmol) foram incubados com 0,042 pmol do inserto também digerido (proporção plasmídeo:inserto de 1:3), 1µL de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 5 U de T4 DNA ligase recombinante (Fermentas) e água ultrapura completando para um volume reacional de 10 µL. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, sem inativação da enzima. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo.

3.3.8 Transformação em bactérias *E. coli* DH5 α

Obtidos os vetores de expressão com o inserto de interesse, após as 16 horas de ligação, os produtos de ligação foram eletroporados em bactérias *E. coli* DH5 α , conforme descrito no item 3.2.7, usando meio seletivo com 200 μ g/mL de ampicilina.

3.3.9 PCR de colônia

As colônias que conseguiram crescer em meio seletivo foram usadas para reação de PCR de colônia, conforme descrito no item 3.2.8, entretanto sem adição de DMSO. Para analisar essas colônias, foram usados os iniciadores P5 e P6. Paralelamente, foram feitas duas reações: uma reação de controle positivo, e uma de controle negativo.

A reação de controle negativo foi feita usando todos os reagentes, mas sem amostra bacteriana, portanto sem molde de DNA. Já a reação de controle positivo, foi feita com amostra de bactéria eletroporada mas usando tanto o iniciador forward quanto o reverso de sequenciamento do sitio de policlonagem do pcDNA3.1(-).

A incubação das reações foi a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95 °C por 40 segundos, 59,5 °C por 45 segundos, 72 °C por 1,4 minutos e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, todas as etapas em termociclador (BioRad MyCycler). As reações foram então analisadas em gel de agarose 1%.

3.3.10 Purificação plasmidial em Pequena Escala (mini-prep) de pcDNA3.1(-) com inserto CD28

Algumas colônias selecionadas das bactérias DH5 α , que apresentaram resultado positivo no PCR de colônia, foram usadas para se fazer uma preparação plasmidial em pequena escala, conforme descrito no item 3.2.9.

3.3.11 Reação de sequenciamento de nucleotídeos

Com o plasmídeo purificado a partir das colônias que apresentaram o inserto na PCR de colônia, foi feita a reação de sequenciamento de nucleotídeos. As reações foram realizadas conforme descrito no item 3.2.11.

As reações de sequenciamento foram feitas incubando 1 μ L de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 μ L de tampão para sequenciamento 5 vezes concentrado, 5 pmol de iniciador forward e reverso para sequenciamento do sitio de policlonagem do pcDNA3.1(-) e 300 ng do plasmídeo em um volume final de 10 μ L. A reação foi realizada a 96 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 44,5 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

As sequências obtidas foram analisadas por alinhamento com a sequência referência usando-se o programa ClustalW.

3.4.EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pET28a(+)

3.4.1 Expressão da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+)

Para expressão da molécula em sistema heterólogo de *E. coli*, foram usadas as bactérias *E. coli BL21 (DE3) STAR*. Primeiramente, algumas colônias foram selecionadas para fazer uma expressão em pequena escala, de modo a avaliar o potencial de expressão, e otimizar o protocolo para aumento de rendimento.

3.4.1.1 Expressão em pequena escala da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+)

Para a expressão em pequena escala, o plasmídeo obtido na clonagem de CD28 foi eletroporado em *E. coli BL21 (DE3) STAR*. As colônias selecionadas em meio LB-ágar com 30 µg/mL de canamicina foram inoculadas em 2 mL desse mesmo meio líquido e cultivadas durante 16 horas a 37 °C e em agitação constante de 220 rpm. Esta cultura saturada foi diluída na proporção 1:100 em 10 mL de meio LB com 30 µg/mL canamicina e crescidas a 37 °C sob agitação constante. Ao atingir a absorbância de 0,7 a 600 nm, cerca de 3,5 horas de crescimento, a cultura foi dividida em duas partes: uma das duas subculturas foi adicionada de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) na concentração final de 1 mM para a indução da expressão da proteína recombinante, e a outra subcultura não recebeu o indutor de expressão. Ambas as culturas, induzida e não induzida com o IPTG, foram incubadas a 37 °C e 220 rpm por 3 e 4 horas.

Alíquotas de 1ml de cada subcultura, a induzida e seu controle não induzido, foram coletadas e centrifugadas a 4000xg por 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 30 µl de tampão de amostra redutor (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e 0.01% azul de bromofenol) e aquecido a

90°C por 5 minutos. Após esse tratamento, 7 µl da amostra foram submetidos à separação eletroforética por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15% (Sambrook et al, 2001). Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de Coomassie para verificação das colônias de alta expressão.

Verificada a colônia que melhor expressa o produto, bem como as melhores condições para expressão da proteína, foi feita uma nova expressão em larga escala, de modo a aumentar a quantidade de proteína obtida.

3.4.1.2 Expressão em larga escala da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+)

Selecionado o clone com alta taxa de expressão da proteína recombinante através do protocolo descrito no item 3.4.1.1, fez-se uma nova expressão da proteína, de modo a obtê-la em grande quantidade.

Para essa expressão foi feito um protocolo semelhante ao descrito no item 3.4.1.1, com a diferença centrada apenas no volume de pré-inóculo e inóculo utilizados, que se alteraram para 10 mL e 1000 mL, respectivamente. Além disso, o tempo de indução das células foi de apenas 3 horas, sob 1 mM de IPTG a 37 °C. Após a indução das células, elas foram coletadas por centrifugação a 5000xg por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e a cultura sedimentada ressuspensa em 100 mL de tampão de lise nativa (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7,0) adicionado de inibidores de protease NEM e PMSF a 1 mM.

A suspensão de células passou por lise mecânica em prensa de French, sob pressão de 1000 Pa, capaz de gerar uma força cisalhante que permite a ruptura das células bacterianas. O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 9000xg e 4°C, e o sobrenadante e o sedimento analisados em gel de poliacrilamida 15% em tampão de amostra redutor (com 5% de β-mercaptoetanol) para verificar em qual dessas porções há mais proteína. Se o sedimento possuir alta quantidade de proteína, deverá ser feita uma purificação desnaturante, uma vez que é provável a presença de CD28 em corpos de inclusão; entretanto, se a proteína estiver em maior quantidade no sobrenadante, pode-se realizar uma purificação nativa.

3.4.2 Purificação da porção extracelular de CD28 clonada em vetor de expressão pET28a(+)

Obtida uma boa quantidade de proteína por expressão em larga escala, a mesma foi purificada. Como o vetor pET28a(+) possui uma cauda de seis histidinas, a purificação dos antígenos foi feita por cromatografia de afinidade a metal imobilizado, no caso o níquel, e eluição com imidazol.

Como a porção extracelular de CD28 foi expressa em corpos de inclusão, foi necessário solubilizá-los para então seguir com a purificação. Para essa etapa, um sedimento de lisado bacteriano, referente a 200 mL de cultura bacteriana induzida com 1mM de IPTG, foi ressuspendido em 20 mL de tampão de lise desnaturante (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 8 M uréia, pH 8,8). A suspensão obtida foi então centrifugada a 9000xg por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante e o sedimento foram analisados em gel de poliacrilamida 15% em tampão de amostra redutor (com 5% de β -mercaptoetanol) para verificar se houve a solubilização da proteína.

Solubilizada a proteína, a suspensão foi incubada com 500 μL de resina de níquel (Ni-NTA Agarose QIAGEN) por 1 hora a 4° C com 20mM de imidazol. A resina foi então lavada com 30 mL de tampão de lise desnaturante acrescido de 40 mM de imidazol. A eluição foi feita com 10 mL de tampão de lise desnaturante adicionado de 300 mM de imidazol, com coletas de amostras de 1 mL cada. Os eluatos obtidos foram analisados em gel de poliacrilamida 15% em tampão de amostra redutor (com 5% de β -mercaptoetanol), e os produtos purificados foram dialisados contra tampão citrato e quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As proteínas purificadas foram alíquotas e estocadas a -20 °C.

3.4.3 Confirmação da proteína expressa e purificada usando ensaio de *Western Blotting*.

Para confirmar se a proteína purificada é de fato a porção extracelular de CD28 com a cauda de histidinas, foi feita uma reação de *Western Blotting* com um

dos eluatos. Para essa reação, uma alíquota de 2 µg de CD28 purificado foi aplicada em gel de poliacrilamida 15%, e as amostras separadas por SDS – PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare), em equipamento específico (Semi-dry Transfer Cell – BioRad) durante 1 hora sob corrente de 1 mA/cm² de gel, em tampão de transferência gelado (39 mM glicina, 48 mM Tris, 20% metanol, 1,25 mM SDS). A membrana foi bloqueada durante 1 hora com TBST (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-₅His (QIAGEN) na concentração de 1:2000 diluído em tampão de bloqueio, por 16 horas à 4 °C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada cinco vezes por três minutos com TBST e em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário, anti-imunoglobulina de camundongo, conjugado a HRP peroxidase HRP, do inglês *horseradish peroxidase* (BD Biosciences) na diluição de 1:8000. A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. Então, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de auto-radiograma Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare) foram expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

3.5.EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)

A expressão da glicoproteína CD28 inteira foi feita em sistema eucariótico, usando as linhagens celulares HEK 293T (293tsA1609neo - ICLC HTL04001), célula de rim embrionário humano, e célula renal símia COS-7 (ATCC Catalog No. CRL-1651), ambas capazes de realizar as modificações pós-traducionais necessárias à proteína de interesse.

Ambas as células foram cultivadas a partir de estoque de célula do laboratório, no qual as células são mantidas, em nitrogênio líquido, a 10⁶ células em meio de congelamento contendo dimetilsufóxido (DMSO).

Após descongelamento, a célula HEK293T foi mantida em MEM (Earle – Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 120 µg de sulfato de gentamicina, com repiques da ordem de 1:6 a cada 48 horas em incubadora a 5% CO₂ e 37°C. A célula COS-7 foi cultivada da mesma maneira, porém usando-se meio DMEM (Dulbecco MEM – Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 120 µg de sulfato de gentamicina.

3.5.1 Expressão da Glicoproteína CD28 em Células HEK293T

A inserção do vetor de expressão nessas células foi feita por transfecção baseando-se na introdução do plasmídeo nas células através de um precipitado que se adere à superfície celular usando cloreto de cálcio em tampão fosfatado, formando um precipitado de fosfato de cálcio ao qual o DNA se liga (CHEN *et al.*, 1987).

Para cada placa de cultivo celular de 60 cm² com confluência entre 60 e 80%, preparou-se 10 mL de solução de transfecção, da seguinte maneira: primeiramente adicionou-se 750 µL de água milli-Q estéril, na superfície da água coloca-se 12 µg do plasmídeo de expressão, então se adiciona 250 µL de CaCl₂ 1 M, e por fim 1 mL de tampão BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄.2H₂O, pH 6,95). A solução foi deixada em repouso por 5 minutos, e então se adicionaram 8 mL de meio de cultivo MEM com 10% de soro fetal bovino e 120 µg de sulfato de gentamicina, e a solução de transfecção foi adicionada às células, ficando em incubadora a 37 °C e 5% CO₂ de 5 a 8 horas, sendo então as células lavadas com PBS e adicionadas de meio de cultivo comum.

Após a transfecção, as células foram deixadas de 48 horas em cultura para a expressão da molécula de interesse. Após este tempo, as células foram removidas da placa de cultivo através de jatos de PBS, sendo então centrifugadas a 2000xg por 5 minutos para formação de sedimento de células. O sedimento celular foi então ressuspenso no triplo de seu volume com tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCL, 1% de NP40, 0,2% Deoxicolato de sódio, 0,5% Triton X-100, pH 7,4) acrescido dos inibidores de proteases PMSF e NEM na concentração final de 1 mM, por 45 minutos em banho de gelo. As amostras foram então centrifugadas a 19000 xg

durante 15 minutos a 4° C, e os extratos tiveram sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford.

As amostras foram submetidas à reação de *Western blotting*, para análise da expressão do CD28. Para isso, cerca de 60 µg de extrato foi aplicado em gel de poliacrilamida 15% em tampão de amostra redutor, e as amostras foram reagidas conforme descrito no item 3.4.3, usando os mesmo anticorpos e as mesmas diluições.

3.5.2 Expressão da Glicoproteína CD28 em COS-7

O intuito de se expressar a proteína nessas células foi verificar se a expressão do CD28 foi similar aquela que ocorre em linfócitos T, ou seja, se a proteína está sendo enviada à membrana celular. Para isso, foram feitos dois ensaios: a imunofluorescência e a citometria de fluxo.

A expressão da proteína em células COS-7 foi feita usando-se a lipofectamina (Lipofectamine 2000-Invitrogen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Após a transfecção, as células foram mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico, por 48 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após este período, as células foram removidas da placa de cultivo através de jatos de PBS com 2 mM de EDTA, sendo então centrifugadas a 2000xg por 5 minutos para formação de sedimento de células.

3.5.2.1 Citometria de fluxo usando células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1 (-)6His

Após a transfecção das células e a remoção das placas de cultivo, elas foram marcadas com anticorpos específicos para se analisar a expressão de CD28 por citometria de fluxo.

Cerca de 10⁶ células foram marcadas com 1 µg de anticorpo comercial contra CD28 de galinha marcado com fluoresceína (Southern Biotech), sendo então

solubilizadas em PBS e lidas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), com a fluorescência detectada no canal FL1 (nm 530/30). Os dados foram analisados com o software BD CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.5.2.2 Imunofluorescência usando células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1 (-)6His-CD28

Para o ensaio de imunofluorescência, cerca de 10^4 células COS-7 foram plaqueadas em lamínulas de vidro de $2,4 \text{ cm}^2$, e após 24 horas transfectadas com lipofectamina (Lipofectamine 2000-Invitrogen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Foram realizadas diferentes condições para análise: células controle não transfectadas, células controle transfectadas com vetor vazio (pcDNA3.1(-)) e células transfectadas com pcDNA3.1(-)6His-CD28. Cerca de 48 horas após a transfecção, as células foram fixadas por 15 minutos em vapor de paraformaldeído, e 15 minutos em paraformaldeído 1%, seguida por 3 ciclos de lavagem com PBS. As células foram então bloqueadas com solução de bloqueio (PBS, 1% BSA) por 2 horas a temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, as células foram acrescidas dos anticorpos primários, no caso, $1 \mu\text{g}/10^4$ células de anticorpo anti-CD28 de galinha marcado com FITC (Southern Biotech), cuja incubação foi feita a 4°C por 16 horas. As células foram lavadas novamente com PBS, e incubadas por 5 minutos com corante de núcleo celular DAPI diluído em PBS a 300 nM (DAPI Nucleic Acid Stain – Invitrogen). Novo ciclo de lavagem foi feito, e as lamínulas de vidro com as células marcadas foram montadas com 7 μL de meio de montagem específico (Fluorescence Mounting Medium – Dako). As células foram então observadas em microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), e analisadas com o programa “VSlider scanning module” (Metasystems, Altlußheim, Alemanha).

3.6.PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAIS CONTRA CD28 DE LINFÓCITOS DE AVES

Para produzir os anticorpos policlonais, foi necessária a imunização de camundongos com a proteína de interesse. Para isso, o projeto foi submetido ao CEEA-SCB-UFPR para aprovação dos procedimentos que envolvam animais de experimentação, sob o certificado nº 615.

3.6.1 Imunização de camundongos Balb/c e Swiss

Para este procedimento houve dois grupos de imunização, cada um com 5 camundongos Balb/c e 1 ou 2 camundongos Swiss. O primeiro grupo foi imunizado com a porção extracelular de CD28 expressa em bactérias e purificada por cromatografia de afinidade. O segundo grupo foi imunizado com a célula inteira HEK/293T expressando toda a proteína CD28. Ambos os grupos receberam três imunizações com intervalo de 15 dias entre cada uma, com volume de 100 µL de suspensão por animal.

Para o primeiro grupo, com 5 Balb/c e 1 Swiss, os camundongos receberam, via intraperitoneal, 30 µg de CD28 purificado contendo 50 µL de adjuvante de Freund, completo na primeira imunização e incompleto nas demais, 1 mg de Al(OH)₃ e PBS completando o volume da dose para 100 µL.

Os camundongos do segundo grupo (5 Balb/c e 2 Swiss) receberam doses via intraperitoneal de células HEK inteiras expressando a proteína CD28 (Roivainen et al, 2005). As doses continham aproximadamente 10⁷ células/dose em PBS, com 50 µL de adjuvante de Freund, completo na primeira imunização e incompleto nas demais e 1 mg de Al(OH)₃.

Quatro dias antes da primeira imunização os animais foram sangrados via periorbital para coleta do soro pré-imune. Cada imunização teve um intervalo de 14 dias, e após 14 dias da última imunização, os soros hiperimunes foram coletados para verificação da resposta imune.

A figura 7 representa os grupos de camundongos imunizados e um esquema das imunizações.

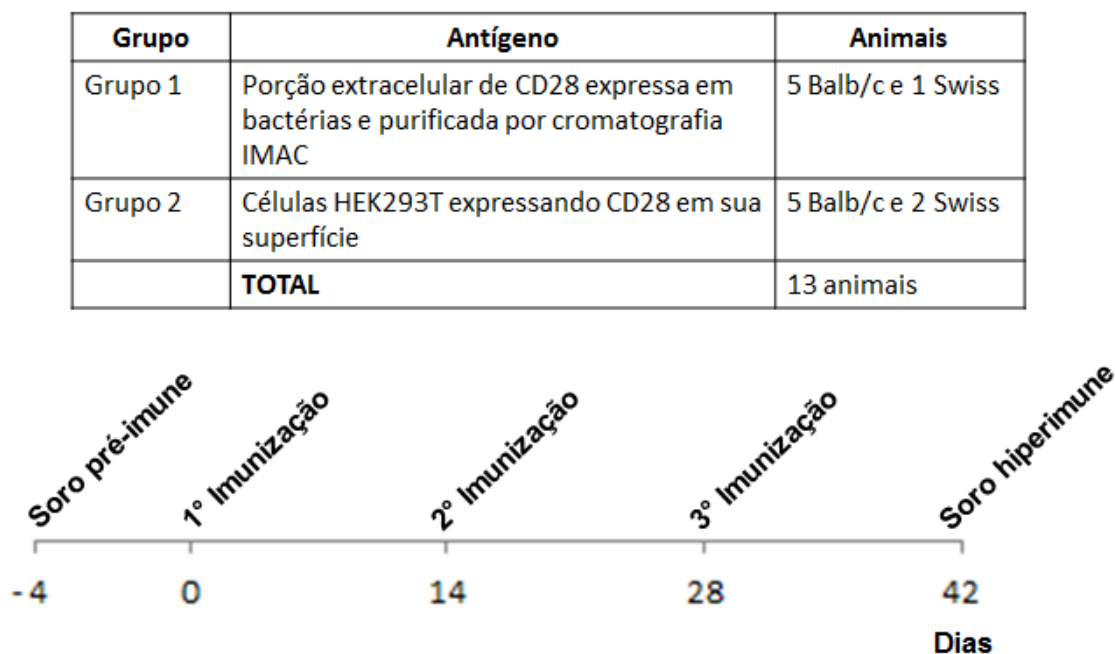


FIGURA 7- REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS IMUNIZADOS E DO PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Detalhamento dos grupos imunizados nesse projeto, com descrição do antígeno usado e do número de animais usados. Além disso, representação do protocolo de imunizações adotado para ambos os grupos.

A verificação da resposta imune dos animais foi feita por ensaios de *western blotting*, como descrito no item 3.4.3, por ensaio imunoenzimático ELISA e por citometria de fluxo.

3.6.2 Análise da resposta humoral frente ao antígeno CD28

Após 14 dias da terceira imunização dos camundongos, foi feita a coleta de sangue a partir da veia periorbital dos animais, para analisar a resposta humoral.

Para obtenção do soro hiperimune, o sangue retirado foi deixado a 37 °C por 1 hora e então centrifugado por 7 minutos a 3000xg, o sobrenadante foi aliquotado e mantido a 4 °C. obtidos esses soros, partiu-se para sua análise.

3.6.2.1 Análise da produção de anticorpos policlonais por ELISA

A primeira análise feita foi o ensaio imunoenzimático ELISA. Para este ensaio, foi feita a imobilização de 50 ng de CD28 expresso em bactéria e purificado em 50 µl de tampão carbonato (100 mM, pH 9,6) por poço de 0,3 cm². Como os anticorpos podem se ligar ao plástico dos poços, não necessariamente ao antígeno, foi feito então o bloqueio dos sítios não ocupados pelo antígeno, com 200 µl/poço de solução de bloqueio (PBS, 1% de albumina bovina) por uma hora a 37 °C. Os soros dos animais imunizados, diluídos de 1:8000 a 1:512000 em PBS com 0,1% de BSA foram incubados por duas horas a 37 °C. Os poços foram então lavados em três ciclos com PBS acrescido de 0,05% de tween 20 (PBST 0,05%), e foi então adicionados 100 µL de anticorpo secundário contra imunoglobulina de camundongo conjugado com HRP (BD Biosciences) diluído 1:8000 em solução de PBS com 1% de albumina bovina. Após incubação de uma hora a 37 °C, fez-se outros três ciclos de lavagens e a reação foi revelada adicionando-se 100 µl/ poço de solução de revelação (0,2 mg/mL de OPD, 100 mM citrato de sódio, 100 mM fosfato de sódio monobásico e 0,0006% (m/v) peróxido de hidrogênio, pH 5,2). Após incubação em câmara escura por 15 minutos, a reação foi bloqueada através da adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1 M. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas com filtro para comprimento de onda a 490 nm (BioRad).

3.6.2.2 Análise dos anticorpos policlonais por *Western blotting*

Verificada a presença de anticorpos reativos, os soros foram testados por *western blotting*, conforme descrito no item 3.4.3.

A reação foi feita utilizando-se 2 µg de CD28 expresso em bactéria e purificado por poço do gel de poliacrilamida, e 70 µg/poço de extrato de HEK293T transfectada com pcDNA3.1(-)6His-CD28. Os soros foram diluídos 1:10000 para serem reagidos com a proteína purificada, e 1:1000 para o extrato de células, usando-se anticorpo secundário anti-imunoglobulina murina ligado a HRP 1:5000 (BD Biosciences).

3.6.2.3 Análise dos anticorpos policlonais por Citometria de Fluxo

Para analisar os soros hiperimunes dos camundongos, foi feita a citometria de fluxo contra linfócitos T de galinha, células que possuem naturalmente CD28 em sua superfície. Primeiramente, foi necessário se isolar os linfócitos do sangue, feito através da separação de células mononucleares do sangue total por gradiente de densidade utilizando ficoll (Histopaque-1077[®] Sigma-Aldrich), de acordo com protocolo já estabelecido (FAIR *et al*, 2008).

O sangue foi diluído na proporção 1:1 em PBS para um volume final de 5 mL. Essa diluição é gentilmente colocada sobre 3 mL de Histopaque-1077 em um tubo de 15 mL e então centrifugada a 400xg, por 30 minutos a temperatura ambiente.

O sedimento (*buffy coat*) resultante de células brancas acima dos eritrócitos foi então coletado e essas células lavadas duas vezes com 4 mL de PBS e centrifugadas a 400xg por 7 minutos. O sedimento final foi ressuspensionado em 5 mL de PBS, e novamente purificado em Histopaque, como descrito anteriormente. Lavadas as células, o sedimento final foi ressuspensionado em PBS com BSA 1% e as células foram contadas utilizando uma câmara de contagem de Neubauer.

Os soros hiperimunes foram então incubados com 10⁶ células mononucleares numa diluição de 1:1000 em PBS usando-se 100 µL de solução, mantida à 37 °C por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas com PBS em três ciclos e

incubadas com 100 µL do anticorpo secundário anti-Ig murina ligado a fluoresceína FITC (Accurate) na diluição de 1:200 à 37 °C por 30 minutos. Novamente as células foram lavadas em três ciclos e o sedimento final ressuspensionado em 250 µl de PBS. As amostras foram citometradas em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson) e os dados analisados no software BD CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.6.3 Obtenção de hibridomas secretores de anticorpos

3.6.3.1 Fusão de células miéloides e esplenócitos de camundongos imunizados contra CD28

A obtenção dos hibridomas tem início na fusão dos esplenócitos do animal imunizado com células de mieloma. Para as fusões, foram utilizadas células mielóides da linhagem P3X63Ag8.653 (ATCC nº CRL-1580™).

Antes da fusão, as células mielóides foram mantidas em meio de manutenção (RPMI (Gibco), 2 mM de glutamina, 20% de soro fetal bovino, 10 µg/mL estreptomicina, 10 U/mL de penicilina e 2,5 µg/mL anfotericina B). Um dia antes da fusão, as células foram repicadas de forma que as placas ficassem com uma confluência de 40 a 60% no momento da fusão.

Três dias antes do dia programado para a fusão, os animais escolhidos, no caso o M2 e o M4, foram imunizados via intravenosa com 20 µg da proteína recombinante purificada em 60 µl de PBS. No dia programado, o animal hiperimune foi anestesiado com uma dose única contendo 20 mg/kg de cloridrato de xilazina (Kensol), 100mg/kg de cloridrato de cetamina (Quetamina) e 3 mg/kg de maleato de acepromazina (Aceproven) e o sangue total coletado por punção cardíaca (eutanásia por exsanguinação e posterior uso do soro como repertório de anticorpos policlonais). Em seguida, o baço foi retirado assepticamente em fluxo laminar, sendo então macerado em meio de manutenção sem soro fetal bovino, para liberação dos esplenócitos. Com o auxílio de uma micropipeta, as células foram dissociadas, e o material então filtrado em seringa contendo um elemento filtrante

constituído por uma malha de nylon estéril. Tais células foram centrifugadas por 10 min a 500xg e então adicionadas de 5 mL de cloreto de amônio gelado (150 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 , 0,1 mM EDTA), incubado por 5min em banho de gelo para que ocorra a lise seletiva de hemácias. Adicionou-se meio de manutenção sem soro para completar 25 mL e a suspensão foi centrifugada novamente por 10 minutos a 500xg. Novamente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se mais 25 mL de meio de manutenção sem soro. As células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado, com o sedimento celular ressuspensionado em mais 20mL de meio sem soro e sua quantificação feita por contagem em câmara de Neubauer.

As células de mieloma foram misturadas aos esplenócitos na proporção de 1:5 e novamente a mistura celular foi centrifugada 10 minutos a 500xg. O sobrenadante foi descartado e, durante 1 minuto, 1 mL de PEG 50% (Roche) aquecido a 37 °C foi gotejado à mistura em constante agitação branda. Adicionou-se então 1 mL de meio de manutenção sem soro gotejando-o durante 2 minutos (com agitação branda), sendo esse passo repetido uma vez. Por fim, adicionou-se 7 mL de meio de manutenção sem soro gotejando-o durante 2 minutos (com agitação branda) e a mistura centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensionadas em volume suficiente de meio de manutenção e distribuídas em placas de 96 poços, a 100 μL /poço na razão de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células por poço.

Como a linhagem de mieloma utilizada é deficiente para HPRT e a via de salvamento de produção de nucleotídeos é dependente de HPRT, uma vez que a aminopterina bloqueia a via de novo da síntese de nucleotídeos, as células deficientes em HPRT (mielomas não fusionados) irão morrer. Os esplenócitos que não se fundiram são inviáveis em cultivo e morrem em cerca de uma semana. Portanto, os hibridomas formados pela fusão entre a célula de mieloma e os esplenócitos possuem a HPRT e tem a capacidade de sobreviver ao meio HAT. Os hibridomas, mesmo com a via de novo bloqueada, são capazes de sintetizar nucleotídeos pela via de salvamento (da qual a hipoxantina e a timidina são intermediários) e são, portanto, as únicas células que sobrevivem ao período de seleção. Tendo isso em mente, no dia seguinte à fusão 100 μL de meio HAT (meio de manutenção, 0,1 mM hipoxantina de sódio, 0,4 μM aminopterina, 0.8 mM timidina) foram adicionados a cada poço. Durante a semana seguinte as células tiveram o seu meio parcialmente trocado duas vezes por meio HAT, essas duas

trocas devem fazer com que a concentração de meio HAT fique em torno de 87,5%, suficiente para a ação da aminopterina. No total, são três adições de meio HAT com uma periodicidade de duas vezes por semana.

Em seguida foram feitas três trocas parciais de meio com meio HT (meio de manutenção, 0,1 mM hipoxantina de sódio, 0.8 mM timidina) mantendo-se a periodicidade. Esse procedimento mantém elevados os níveis dos intermediários da via de salvamento e vão diluindo a aminopterina até aproximadamente 11%. Dessa forma, os hibridomas foram mantidos pelos intermediários até que as diluições sucessivas em meio RPMI fossem suficientes para que a concentração da aminopterina não afete mais as células.

3.6.3.2 Manutenção dos hibridomas

As células foram mantidas em meio de manutenção com a mesma periodicidade de troca, cerca de 72 horas, até o fim do período de varredura dos hibridomas.

Os clones considerados negativos no processo de varredura foram eliminados com a adição de uma solução de NaOH 1 M corada com azul de metileno. Este procedimento reduz a possibilidade de contaminação e identifica facilmente os poços que já foram inutilizados na placa de cultivo.

3.6.3.3 Varredura dos hibridomas

A presença ou ausência de anticorpos produzidos contra antígeno recombinante tanto nos soros hiperimunes quanto nos sobrenadantes de cultura foi avaliada através de ensaio imunoenzimático ELISA.

Este ensaio foi feito conforme descrito no item 3.6.2.1, usando-se 100 µL de sobrenadante do cultivo de hibridomas como anticorpo primário, com o secundário anti-imunoglobulina murina ligado a HRP em diluição 1:8000 (BD Biosciences). Como controle negativo da reação utilizou-se o meio de manutenção do hibridoma, e

como controle positivo utilizou-se o soro hiperimune do animal M2 na diluição 1:1000.

3.6.3.4 Diluição limitante

Após a varredura dos hibridomas, as células positivas para a secreção de anticorpo contra CD28 de galinha passam por um processo chamado de diluição limitante. Essa etapa tem por objetivo isolar apenas uma célula secretora de anticorpo, garantindo a produção de um anticorpo monoclonal.

Para essa diluição limitante, foi utilizada uma placa de 96 poços para cada clone secretor de anticorpos. Na primeira linha da placa (linha A) foram plaqueadas 200 células do hibridoma em 200 µL de meio de cultivo, e as linhas restantes (linhas B a H) receberam apenas 100 µL do meio de cultivo. Da linha A foram removidos 100µL, que foram então solubilizados na linha B, bastante homogeneizados, e novamente 100 µL foram removidos da linha B e passados para a linha C. Esse processo foi repetido até a linha H, onde os últimos 100 µL foram removidos e descartados. Desse modo, criou-se na placa de cultivo uma quantidade decrescente de células, indo de 100 células/poço até 0,8 célula/poço. A figura 8 esquematiza como foi feita a diluição limitante de cada clone.

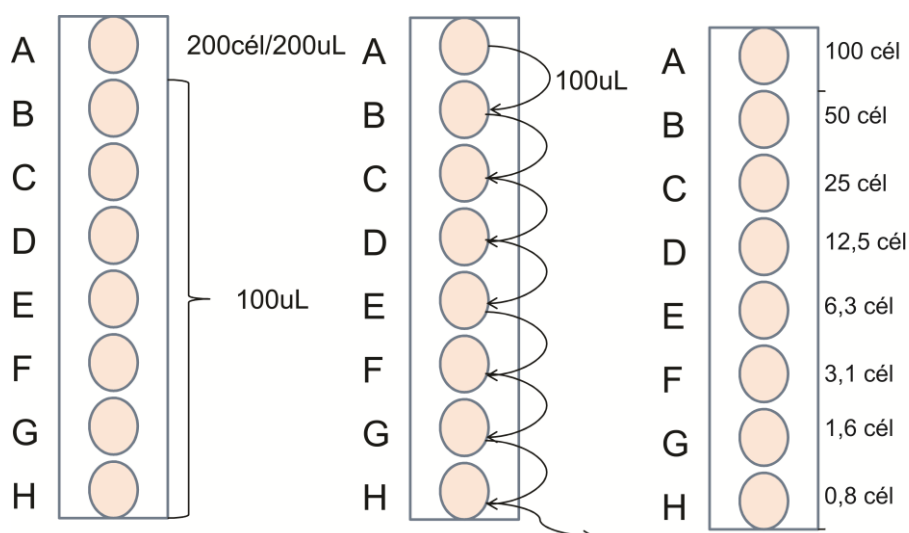


FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE DILUIÇÃO LIMITANTE DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Representação da metodologia utilizada para se isolar apenas uma célula secretora de anticorpo, para que se possa obter um anticorpo monoclonal.

Após a diluição limitante, as células foram observadas em microscópio óptico invertido para se garantir o isolamento adequado de uma célula. Feita a diluição, os clones foram varridos por ELISA, e os clones positivos sofreram nova diluição limitante, para haver total certeza de que apenas uma célula originou a colônia produtora de anticorpo.

3.6.3.5 Caracterização do anticorpo monoclonal por imunoensaios

Obtido o clone produtor de anticorpo monoclonal, diferentes imunoensaios foram realizados para avaliar seu reconhecimento do CD28 de galinha.

3.6.3.5.1 *Western Blotting*

Para avaliar o reconhecimento do mAb por *western blotting*, conforme descrito no item 3.6.2.2.

A reação foi feita com 1 µg/poço de CD28 expresso em bactéria e purificado e 70 µg/poço de extrato de HEK293T transfectada com pcDNA3.1(-)6His-CD28. Os sobrenadantes dos hibridomas foram obtidos após 72 horas de cultivo contendo aproximadamente $5 \cdot 10^6$ células, e usados sem diluição para reagirem com as proteínas. O anticorpo secundário foi o anti-imunoglobulina murina HRP 1:8000 (BD Biosciences).

3.6.3.5.2 Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo, foi usada a mesma metodologia descrita no item 3.6.2.3, usando-se células mononucleares de sangue periférico de galinha.

Os sobrenadantes dos hibridomas, obtidos conforme descrito no item anterior, foram dialisados contra PBS diluído 10 vezes e então concentrados cerca de 10 vezes em concentrador SPD2010 Integrated SpeedVac System (Thermo) e incubados com 10^6 células mononucleares numa diluição de 1:1 em PBS usando-se 60 µL de solução, mantida à 37 °C por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas com PBS em três ciclos e incubadas com 20 µL do anticorpo secundário anti-Ig murina ligado a fluoresceína FITC (Accurate) na diluição de 1:200 à 37 °C por 30 minutos. Novamente as células foram lavadas e o sedimento final ressuspenso em 250 µL de PBS. As células também foram marcadas com anti-CD28 de galinha da Southern Biotech. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD Biosciences) e os dados analisados no software BD CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.6.3.5.3 Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi feito conforme descrito no item 3.5.2.2, usando-se células COS-7 transfectadas, por lipofectamina, com vetor vazio (pcDNA3.1(-)6His) e células transfectadas com pcDNA3.1(-)6His-CD28.

As células transfectadas foram marcadas com 400 µL de sobrenadante de hibridoma, a 4 °C por 16 horas. Após lavagem, foi feita a incubação com 50 µL do anticorpo secundário reativo a imunoglobulina murina ligado a fluoresceína FITC (Accurate) na diluição de 1:200 à temperatura ambiente por 2 horas. Como controle negativo foi usado o meio de cultivo de hibridoma.

3.6.3.5.4 Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi feita usando-se extrato de células mononucleares de sangue periférico de galinha. Após a purificação dessas células, como já descrito anteriormente, foi feita a lise em tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 1% de NP40; 0,2% Deoxicolato de sódio) acrescido dos inibidores de proteases PMSF e NEM a 1 mM por 45 minutos em banho de gelo e, então centrifugadas a 19000 xg durante 15 minutos a 4°C.

O extrato celular foi clarificado pela incubação prévia com 40 µl proteína A/G sepharose (GE Bioscience) acrescido de 10 µl de soro normal de camundongo durante 3 horas a 4 °C. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada durante 5 min 19000 xg a 4 °C e metade do sobrenadante obtido foi incubado com uma resina controle e outra metade com uma resina específica durante 16 horas a 4 °C. A resina controle foi obtida pela incubação de 40 µl de proteína A/G sepharose com 600 µL de meio de cultivo de hibridoma e 200 µL de tampão de lise. Já a resina específica foi obtida pela incubação de mesma quantidade de proteína A/G sepharose com 600 µL de sobrenadante do hibridoma secretor de anticorpo contra CD28 e 200 µL de tampão de lise. Ambas as colunas tiveram incubação de 3 horas a 4 °C. Após o tempo de incubação do lisado de PBMC com os anticorpos previamente ligados as resinas de proteína A/G sepharose, as matrizes contendo os imunocomplexos

ligados foram lavadas 5 vezes com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com 35 µl tampão não redutor, fervido a 96 °C durante dez minutos e submetido a reação de western blotting, tendo como anticorpo primário o próprio mAB anti CD28 e como secundário anti-Ig murina, conforme descrito no item 3.3.5.1.

3.6.6 Ensaio de ligação de CD28 recombinante com macrófagos de galinha

Para analisar a capacidade da molécula recombinante expressa em bactérias de se ligar a proteína B7 endógena, foi feito um ensaio de ligação. Como macrófagos expressam os receptores de CD28, CD80 e CD86, foi utilizada a metodologia descrita por (GUIMARÃES *et al.* 2011).

Primeiramente, monócitos foram isolados do sangue de galinha usando-se a capacidade de adesão diferencial dessas células a substratos plásticos. Para isso, foi feita a purificação de PBMC, como descrito anteriormente, e então 2×10^7 células/mL foram plaqueadas em placas de plástico por 1 hora a 37°C e 5% CO₂ em meio RPMI adicionado de 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina. As células que não se aderiram foram removidas e as que permaneceram em contato com o plástico foram lavadas varias vezes com meio RPMI e então adicionadas do meio de cultivo, composto por RPMI suplementado com 2% de soro de galinha inativado, 8% de soro fetal bovino, 1 U/ml de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina, de modo a se diferenciarem em macrófagos. Atingidas 72 horas de cultivo, os macrófagos foram ativados com 10 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella*.

Os macrófagos foram então removidos das placas usando-se EDTA, e então incubados com 1 µg/10⁶ células da porção extracelular de CD28 recombinante, por 30 minutos a 4 °C. Varias lavagens foram feitas com PBS gelado, e então as células foram incubadas com sobrenadante de hibridoma e anticorpo secundário anti-imunoglobulina murina conjugado a FITC, como descrito anteriormente para citometria de fluxo. Essas células foram também incubadas com anticorpo anti-MHC de classe II conjugado a FITC (Southern Biotech), para garantir que se estava trabalhando com APCs, a 1 µg/10⁶ células.

4.RESULTADOS

4.1.CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULA BACTERIANA

A clonagem da porção extracelular de CD28 iniciou-se com a obtenção do fragmento de DNA a ser inserido no vetor de expressão pET28a(+). Esse fragmento de DNA foi amplificado de forma adequada através da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos desenhados P1 e P2.

A figura 9 evidencia que a obtenção do inserto foi satisfatória, uma vez que se observa uma banda única de produto em 430 pb conforme esperado.

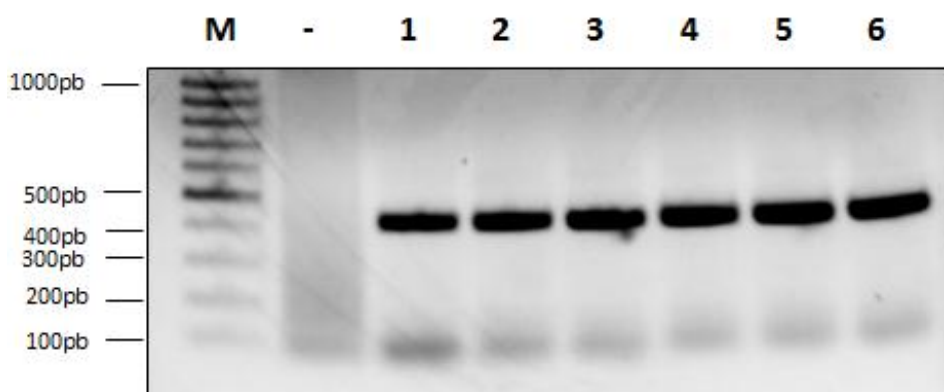


FIGURA 9- OBTENÇÃO DO INSERTO PARA CLONAGEM DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR usando como molde cDNA de células mononucleares de sangue periférico de galinha.

LEGENDA: Controle negativo sem uso de DNA molde (linha -), o uso de DNA molde e iniciadores específicos nas condições de PCR descritas gerou bandas de DNA de 430pb (linhas 1 a 6), M: GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

O fragmento especificamente amplificado e digerido com as enzimas *NheI* e *XhoI* foi submetido ao processo de ligação com o vetor pET28a(+). Após a reação de ligação, o produto foi utilizado para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5α de *E. coli*. Os clones crescidos em meio LB sólido contendo antibiótico para seleção foram então usados para realização de uma PCR de colônia para verificação dos clones que de fato apresentavam o inserto de interesse (figura 10).

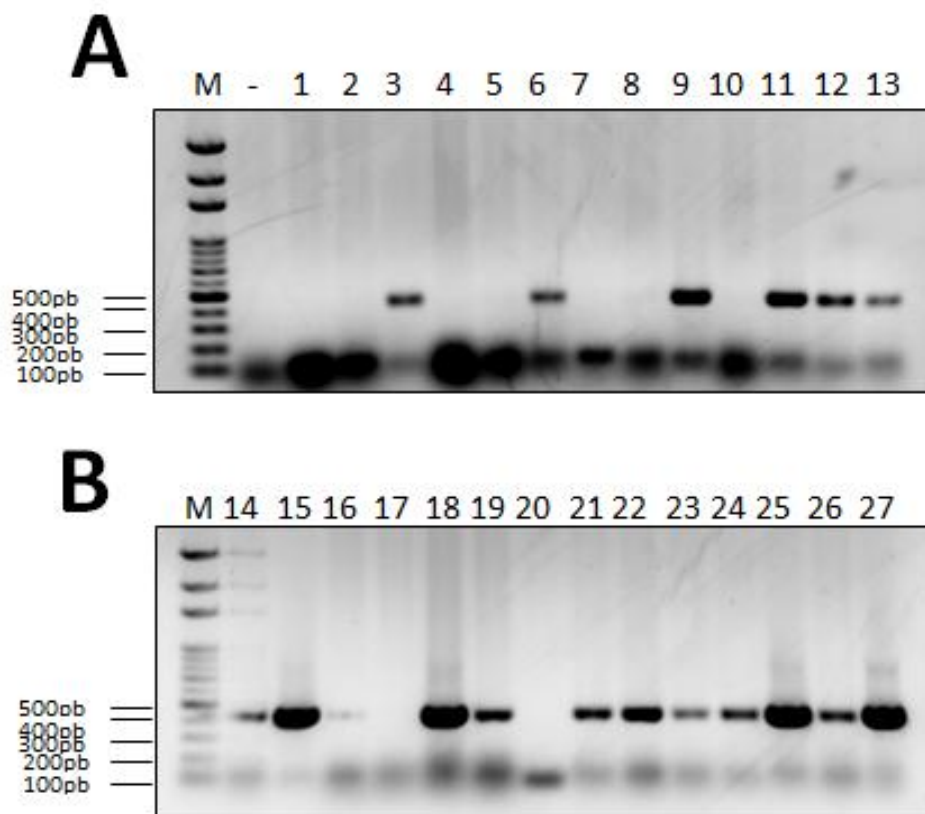


FIGURA 10- PCR DE COLÔNIA COM BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO PET28A(+)-CD28

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR usando como molde o DNA de bactérias transformadas com o vetor de expressão obtido com a reação de ligação de pET28a(+) com o inserto da porção extracelular de CD28.

LEGENDA: O controle negativo (linha -) representa a PCR com bactérias que cresceram em meio seletivo apesar de terem sido transformadas com o plasmídeo ligado sem inserto. Diversas colônias de bactérias transformadas foram analisadas (linhas 1 a 27), M: GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

Pode-se observar que varias bactérias que cresceram em meio seletivo estavam sem inserto, indicando falsos positivos. Porém, observa-se que várias colônias possuem o inserto, na altura esperada de 430pb. Dessas, quatro colônias (colônias, 3, 6, 9 e 21) foram selecionadas para a realização da purificação plasmidial em pequena escala. O plasmídeo clonado purificado foi submetido à digestão dupla usando as enzimas de restrição empregadas na clonagem para verificação da liberação do inserto de interesse bem como verificação da manutenção dos sítios de restrição (figura 11).

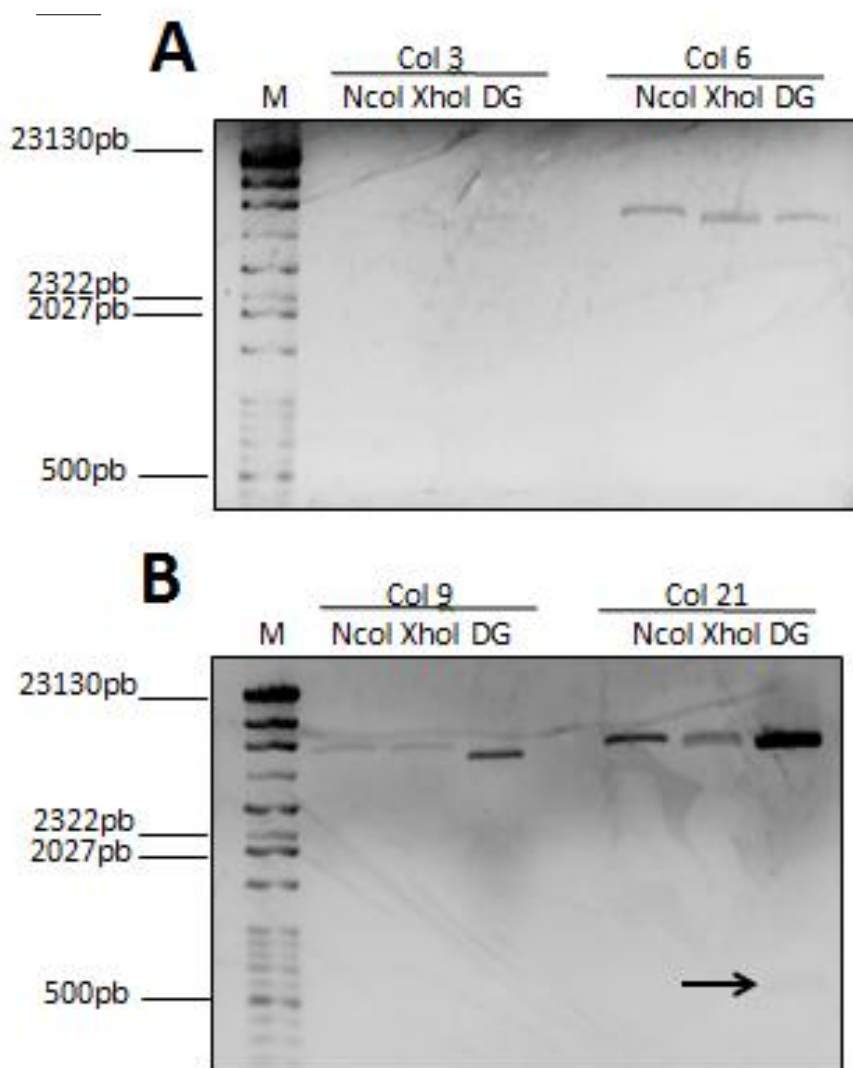


FIGURA 11- TESTE DE DIGESTÃO DE PLASMÍDEOS PURIFICADOS A PARTIR DE QUATRO COLÔNIAS DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO PET28A(+)-CD28

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos de digestão dos plasmídeos purificados a partir das colônias 3, 6, 9 e 21 de bactérias transformadas com o vetor de expressão pET28a(+)-CD28.

LEGENDA: Plasmídeo digerido de três maneiras: com apenas a enzima *NcoI* (linha *NcoI*), com apenas a enzima *XhoI* (linha *XhoI*) e com ambas as enzimas (linha DG), M: GeneRuler 100 pb DNA Ladder e Lambda DNA/*HindIII*.

Pela figura 11 pode-se observar que o plasmídeo da colônia 3 não é visualizado no gel, em nenhuma das condições de digestão. Talvez a quantificação do plasmídeo tenha sido errônea, de modo que a massa usada no teste de digestão foi bem abaixo do esperado, ficando abaixo do limite de detecção do brometo de etídio. Quanto ao plasmídeo da colônia 6, verifica-se um perfil eletroforético

incomum em testes de digestão, pois a digestão com apenas a enzima *NcoI* gerou um produto de massa maior que a digestão com a enzima *XhoI* ou com a dupla digestão. Já os plasmídeos das colônias 9 e 21 apresentam um resultado satisfatório, pois pode-se verificar que quando digeridos com ambas as enzimas, a massa dos produtos gerados é menor do que em relação a digestão simples. Isso ocorre devido à liberação do inserto clonado no plasmídeo, fato que pode ser observado principalmente no plasmídeo da colônia 21, pois é possível observar o fragmento de cerca de 493pb no gel. Vale lembrar que como foi usada a enzima *NcoI* ao invés da *NheI*, o inserto liberado não apresenta 430 pb como o clonado, mas sim 493 pb. Essa diferença se deve a adição de 63 pb referente à distância dos sítios de ação das enzimas no sitio de policlonagem do pET28a(+).

Após a análise do teste de digestão, os plasmídeos foram sequenciados a fim de se determinar sua sequência de nucleotídeos, para avaliar possíveis mutações. O plasmídeo purificado a partir da colônia 21 foi o que apresentou melhor resultado, sem mutações na sua sequência e com o inserto de CD28 devidamente clonado no pET28a(+).

```

ref_seq      TTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCC 120
CD28_21      ATCCCTCTAG-AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCC 70
; * *****
ref_seq      ATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCGTAA 180
CD28_21      ATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCGTAA 130
*****
ref_seq      CAGAAAACAAGATTCTAGTGGCTCAGCGTCTTTTGCTCATGTAGCCAAACAGAACAGCAA 240
CD28_21      CAGAAAACAAGATTCTAGTGGCTCAGCGTCTTTTGCTCATGTAGCCAAACAGAACAGCAA 190
*****
ref_seq      CTCTAGTCTGCAACTACACATACAATGGAAACAGGGAAAGAATTTGAGCCTCGCTGCACA 300
CD28_21      CTCTAGTCTGCAACTACACATACAATGGAAACAGGGAAAGAATTTGAGCCTCGCTGCACA 250
*****
ref_seq      AAGGAACAGACAGTGCAGTCGAAGTCTGCTTTATTTTCATGGAACATGACCAAAATTAACA 360
CD28_21      AAGGAACAGACAGTGCAGTCGAAGTCTGCTTTATTTTCATGGAACATGACCAAAATTAACA 310
*****
ref_seq      GTAATTCAAATAAGGAATTCAACTGTCGGGGGATTATGATAAGGACAAAGTAATCTTCA 420
CD28_21      GTAATTCAAATAAGGAATTCAACTGTCGGGGGATTATGATAAGGACAAAGTAATCTTCA 370
*****
ref_seq      ATCTTTGGAATATGAGTGCCAGCCAACTGACATCTACTTCTGCAAAATCGAGGCCATGT 480
CD28_21      ATCTTTGGAATATGAGTGCCAGCCAACTGACATCTACTTCTGCAAAATCGAGGCCATGT 430
*****
ref_seq      ATCCACCTCCATATGTCTATAATGAGAAGAGCAATGGGACTGTCAATTCATGTGAGAGAGA 540
CD28_21      ATCCACCTCCATATGTCTATAATGAGAAGAGCAATGGGACTGTCAATTCATGTGAGAGAGA 490
*****
ref_seq      CACCCATCCAAACACAAGAACCTGAATCTGCAACTTCTTACTGGTAACTCGAGCACCACC 600
CD28_21      CACCCATCCAAACACAAGAACCTGAATCTGCAACTTCTTACTGGTAACTCGAGCACCACC 550
*****
ref_seq      ACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTG 660
CD28_21      ACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTG 610
*****

```

FIGURA 12- SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA 21 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO pET28a(+)-CD28

FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: Alinhamento da sequência referência (ref_seq) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos (CD28_21). O símbolo (*) representa bases nitrogenadas da sequência analisadas que coincidem com aquelas da referência. Em amarelo observa-se o códon de início de tradução (ATG), seguido pela cauda de seis histidinas *in tandem*, destacada em azul. Observa-se em rosa o sítio de ação das enzimas de restrição, *NheI* e *XhoI* respectivamente, com um códon de término de tradução (TAA) em verde logo antes do sítio de ação da *XhoI*.

Pela figura 12 pode-se verificar que entre os sítios de restrição das enzimas a sequência do CD28 clonado está igual a da sequência referência, sem mutações de bases nitrogenadas. Desse modo, portanto, verifica-se que a clonagem foi realizada com sucesso.

4.2 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE CD28 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULA DE MAMÍFERO

Para clonar a sequência codificadora de CD28 no vetor de expressão desejado, primeiro foi feita a modificação do plasmídeo comercial, de modo a inserir em seu sítio de policlonagem uma sequência codificadora para cauda de histidina.

Inicialmente, o pcDNA3.1(-), foi digerido com as enzimas *BamHI* e *Acc65I* seguida da adição de uma sequência codificadora para seis histidinas obtida através do anelamento dos iniciadores P3 e P4. Após a ligação do inserto no plasmídeo o novo produto foi usado para transformar bactérias. As colônias crescidas em meio seletivo foram analisadas por PCR de colônia. A figura 13 mostra o resultado obtido.

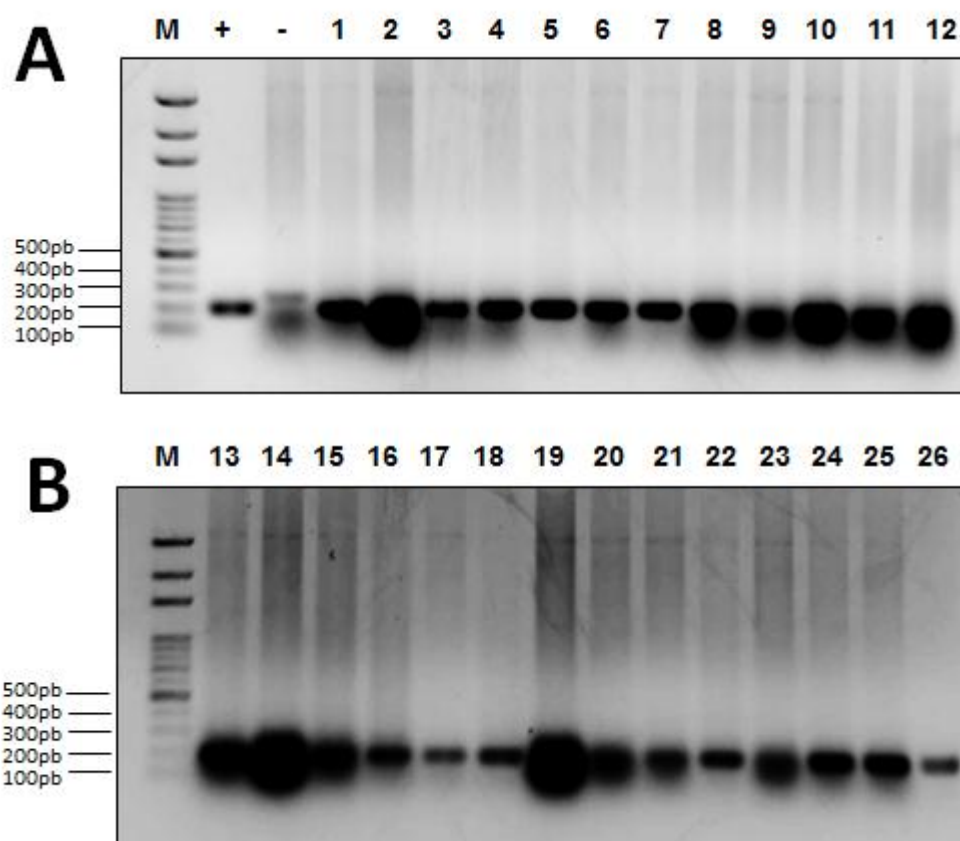


FIGURA 13- PCR DE COLÔNIA COM BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR usando como molde bactérias transformadas com o vetor de expressão obtido com a reação de ligação de pcNA3.1(-) com o inserto gerado pelo anelamento dos iniciadores P3 e P4.

LEGENDA: Controle negativo (linha -) representa a PCR sem bactérias, e o controle positivo (linha +) representa a amplificação do sítio de policlonagem do pcDNA3.1(-). Diversas colônias de bactérias transformadas foram analisadas (linhas 1 a 26). M: GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

Como a PCR de colônia foi feita usando-se um iniciador *forward* para sequenciamento do sítio de policlonagem do plasmídeo, e um reverso usado na montagem do inserto, as colônias que possuírem o plasmídeos modificado serão aquelas cujo DNA permitiu amplificação de um produto de cerca de 260 pb, e pela figura 13 verifica-se que há diversas colônias que o fizeram. Em contrapartida, o controle negativo parece apresentar uma banda entre 200 e 300 pb, apesar de muito difusa e de maior massa em relação ao controle positivo. Desse modo, foram selecionadas as colônias 7, 8, 16 e 22 para terem o plasmídeo purificado e sua sequência de nucleotídeos determinada.

Obtidos os plasmídeos a serem sequenciados, analisou-se a sequência obtida para verificar a presença da cauda de histidina no vetor. A figura 14 mostra o resultado.

```

ref_seq      GACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCG 240
col_8        GACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCG 80
*****

ref_seq      GCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCACCACACTGGACTAGTGGATCCCATCAT 300
col_8        GCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCACCACACTGGACTAGTGGATCCCATCAT 140
*****

ref_seq      CATCATCATCATTAGGTACCAAGCTTAAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCT 360
col_8        CATCATCATCATTAGGTACCAAGCTTAAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCT 200
*****

ref_seq      TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCGCTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT 420
col_8        TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCGCTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT 260
*****

```

FIGURA 14- SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA 8 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1 (-)6His

FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: Alinhamento da sequência referência (ref_seq) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos (col_8). O símbolo (*) representa bases nitrogenadas da sequência analisada que coincidem com aquelas da referência. O resultado do sequenciamento indica a presença das 18 bases nitrogenadas que codificam para a cauda de histidina, representadas em cor azul, além do códon de término de tradução (TAG) em rosa, e os sítios de ação das enzimas de restrição usadas na clonagem do inserto, em amarelo.

Observa-se pelo resultado do sequenciamento a presença da cauda de histidina no vetor, inserida na região de interesse.

O pcDNA3.1(-)6His gerado nesse trabalho possui não apenas a cauda de histidinas no vetor mas também manteve intacto os sítios de ação das diversas enzimas de restrição do sítio de policlonagem. Desta forma foi gerada importante ferramenta molecular, a qual será utilizada por outros membros do grupo na produção de diversas proteínas.

Obtido o plasmídeo a ser usado para inserir a sequência codificadora de CD28, partiu-se para a obtenção do fragmento de DNA referente a tal sequência. A reação de PCR usando-se os iniciadores P5 e P6 foi satisfatória, pois permitiu a obtenção de um fragmento de DNA de tamanho esperado de 693 pb, conforme análise em gel de agarose (figura 15).

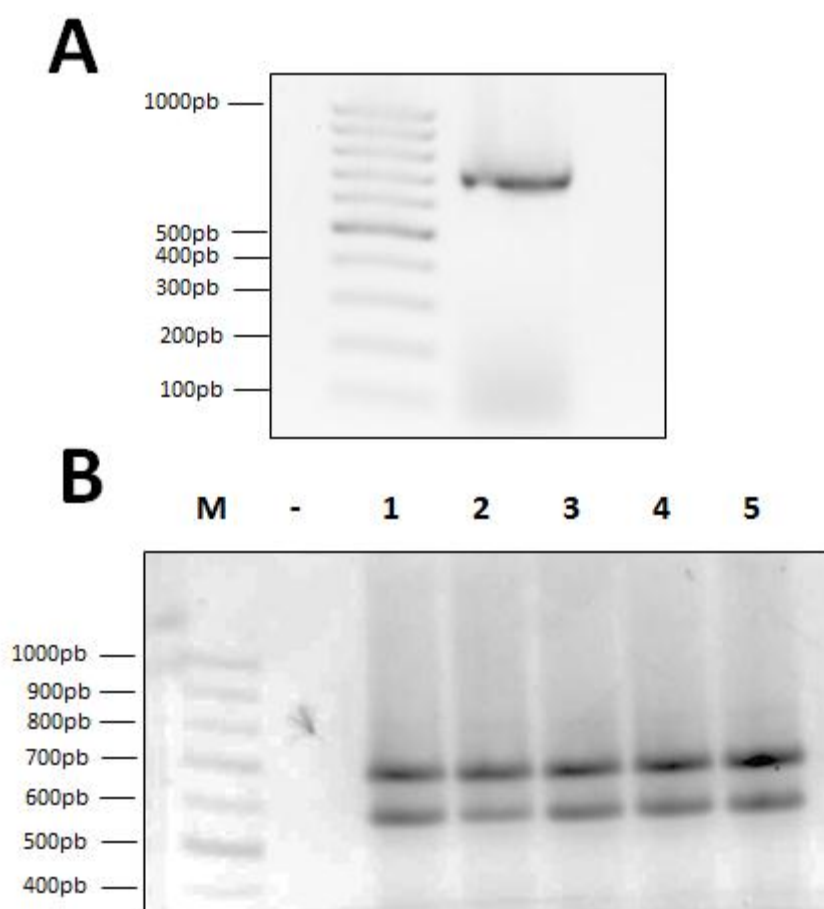


FIGURA 15- OBTENÇÃO DO INSERTO PARA CLONAGEM DA GLICOPROTEÍNA CD28

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR usando como molde cDNA de células mononucleares de sangue periférico de galinha

LEGENDA: A) PCR piloto na qual as condições de ciclagem térmica foram estabelecidas. B) Repetição da PCR piloto do item A), porém repetida 5 vezes para aumentar a quantidade de produto. O controle negativo sem uso de DNA molde (linha -) reflete ausência de produto amplificado, o uso de DNA molde e iniciadores específicos nas condições de PCR descritas gerou bandas de DNA de massa esperada de 693 pb (linhas 1 a 5). M: GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

A figura 15 mostra os produtos obtidos na PCR. O item A) é a PCR piloto que determinou as condições a serem usadas, uma vez que se obteve um produto de banda única de massa desejada, 693 pb. Entretanto, ao se repetir essa mesma PCR em um numero de reações 5 vezes maior, obteve-se um produto de banda dupla, conforme visto no item B). Entretanto, como o material da PCR seria usado em uma reação de digestão, decidiu-se cortar apenas a banda desejada, no caso a de cima, e utilizá-la normalmente.

Obtido o inserto, este foi digerido com as enzimas *NheI* e *BstXI*, juntamente com o pcNA3.1(-)6His. Os produtos digeridos foram ligados com enzima específica e

então inseridos em bactérias *E. coli* da estirpe DH5 α . As colônias crescidas em meio sólido com antibiótico seletivo foram analisadas quanto a presença de inserto em seus plasmídeos por reação de PCR de colônia. O resultado encontra-se na figura 16.

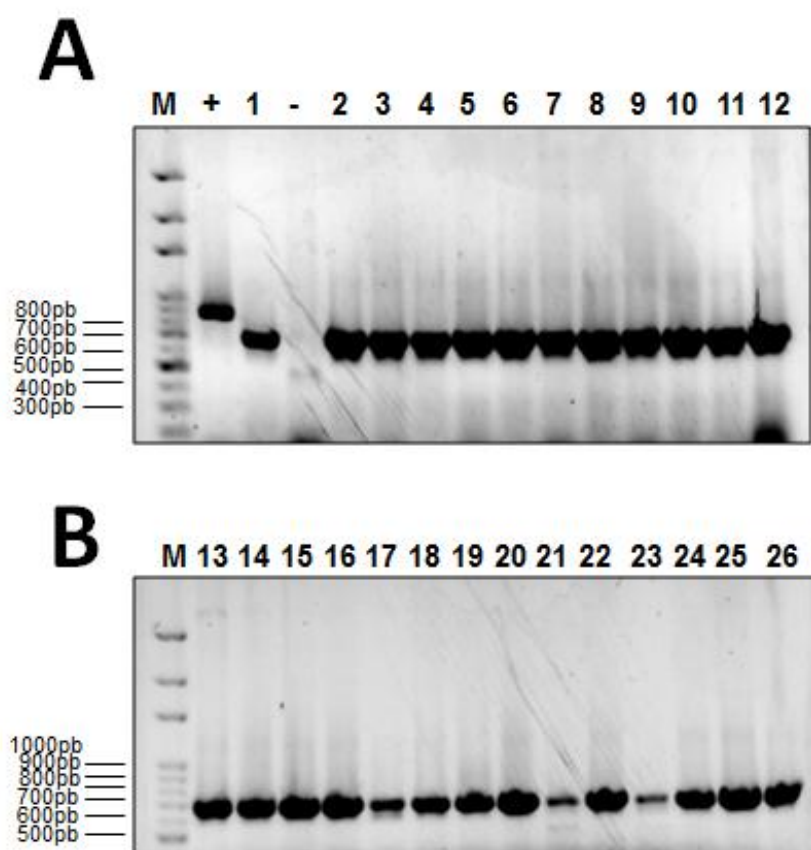


FIGURA 16- PCR DE COLÔNIA COM BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His-CD28

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR usando como molde bactérias transformadas com o vetor de expressão obtido com a reação de ligação de pcDNA3.1(-)6His com o inserto que codifica para a glicoproteína CD28.

LEGENDA: Controle negativo (linha -) representa a PCR sem bactérias, e o controle positivo (linha +) representa a amplificação do sítio de policlonagem do pcDNA3.1(-)6His-CD28. Diversas colônias de bactérias transformadas foram analisadas (linhas 1 a 26). M: GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

Pela imagem, verifica-se que todas as colônias coletadas possuem o inserto, que aparece na altura esperada de 693 pb. Quanto ao controle positivo ele está conforme esperado, pois a massa do produto obtido é coerente com aquela do sítio de policlonagem do pcDNA3.1(-)6His com a sequência do CD28, gerando um produto de cerca de 932 pb. O controle negativo apresenta-se conforme esperado também, pois não há nenhum produto amplificado nessa condição. Desse modo,

quatro colônias foram selecionadas para a reação de sequenciamento: colônias 5, 8, 16 e 24.

Após a purificação dos plasmídeos dessas colônias, eles passaram por reação de sequenciamento para determinar sua sequência de nucleotídeos. O resultado obtido foi alinhado com a sequência referência esperada, conforme encontra-se na figura 17.

ref_seq	GACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTGGCTAGCGCCACCATGCTGGGGATCCTCGTGGTGC	240
col_5F	GACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTGGCTAGCGCCACCATGCTGGGGATCCTCGTGGTGC	83
ref_seq	TCTGCCTCATCCCTGCTGCAGATGTAACAGAAAACAAGATTCTAGTGGCTCAGCGTCCTT	300
col_5F	TCTGCCTCATCCCTGCTGCAGATGTAACAGAAAACAAGATTCTAGTGGCTCAGCGTCCTT	143
ref_seq	TGCTCATTGTAGCCAACAGAACAGCAACTCTAGTCTGCAACTACACATACAATGGAACAG	360
col_5F	TGCTCATTGTAGCCAACAGAACAGCAACTCTAGTCTGCAACTACACATACAATGGAACAG	203
ref_seq	GGAAAGAATTTTCGAGCCTCGCTGCACAAAGGAACAGACAGTGCAGTGCAGTCTGCTTTA	420
col_5F	GGAAAGAATTTTCGAGCCTCGCTGCACAAAGGAACAGACAGTGCAGTGCAGTCTGCTTTA	263
ref_seq	TTTCATGGAACATGACCAAAATTAACAGTAATTCAAATAAGGAATTCAACTGTGCGGGGA	480
col_5F	TTTCATGGAACATGACCAAAATTAACAGTAATTCAAATAAGGAATTCAACTGTGCGGGGA	323
ref_seq	TTTCATGATAAGGACAAAGTAATCTTCAATCTTTGGAATATGAGTGCCAGCCAAACTGACA	540
col_5F	TTTCATGATAAGGACAAAGTAATCTTCAATCTTTGGAATATGAGTGCCAGCCAAACTGACA	383
ref_seq	TCTACTTCTGCAAAATCGAGGCCATGTATCCACCTCCATATGTCTATAATGAGAAGAGCA	600
col_5F	TCTACTTCTGCAAAATCGAGGCCATGTATCCACCTCCATATGTCTATAATGAGAAGAGCA	443
ref_seq	ATGGGACTGTCATTGTCAGAGAGACACCCATCCAAACACAAGAACCTGAATCTGCAA	660
col_5F	ATGGGACTGTCATTGTCAGAGAGACACCCATCCAAACACAAGAACCTGAATCTGCAA	503
ref_seq	CTTCTTACTGGGTCATGGTGGCAGTGACGGGACTTCTTGGTTTCTACAGTATGCTTATAA	720
col_5F	CTTCTTACTGGGTCATGGTGGCAGTGACGGGACTTCTTGGTTTCTACAGTATGCTTATAA	563
ref_seq	CTGCAGTCTTTTATAATCTACCGGCAAAAATCCAAGAGGAACAGGTACCGTCAGAGTGACT	780
col_5F	CTGCAGTCTTTTATAATCTACCGGCAAAAATCCAAGAGGAACAGGTACCGTCAGAGTGACT	623
ref_seq	ACATGAATATGACCCCGGGCATCCACCTCACCAGAAGAACCAAGGGCTAACCATCCTATG	840
col_5F	ACATGAATATGACCCCGGGCATCCACCTCACCAGAAGAACCAAGGGCTAACCATCCTATG	683
ref_seq	CACCAACACGAGACTACACTGCATATCGCTCCTGGCAGCCACCACACTGGACTAGTGGAT	900
col_5F	CACCAACACGAGACTACACTGCATATCGCTCCTGGCAGCCACCACACTGGACTAGTGGAT	743
ref_seq	CCCATCATCATCATCATCATTTAGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGA	960
col_5F	CCCATCATCATCATCATCATTTAGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGA	803

FIGURA 17- SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA 5 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1 (-)6His-CD28

FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: Alinhamento da sequência referência (ref_seq) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos (col_5F). O símbolo (*) representa bases nitrogenadas da sequência analisada que coincidem com aquelas da referência. Sítios de restrição das enzimas *NheI* e *BstXI* destacados em amarelo respectivamente. Em azul, encontra-se a cauda de histidinas inserida no vetor, com as últimas três bases (em rosa) referentes ao códon de término de tradução. Em vermelho está indicada a única base mutada da sequência.

O resultado do sequenciamento indica a presença do inserto devidamente posicionado entre os sítios das enzimas de restrição *NheI* e *BstXI*. Analisando-se a sequência que codifica para o CD28, é possível observar a presença de uma base mutada (marcação em cor vermelha), na qual uma citosina foi substituída por uma adenina. Verifica-se que, com base na fase de leitura, houve a substituição de um códon CCC por um CCA. Isso levou a uma mutação silenciosa, pois ambos os códons codificam para o aminoácido prolina, de modo que não há nenhum problema nessa mudança de base. Portanto, o plasmídeo sequenciado está satisfatório e pode ser usado para expressar a glicoproteína CD28.

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pET28a(+)

Para analisar a expressão da porção extracelular de CD28 usando o plasmídeo obtido anteriormente, foi feita uma expressão em pequena escala da proteína. O resultado obtido por SDS-PAGE pode ser observado na figura 18.

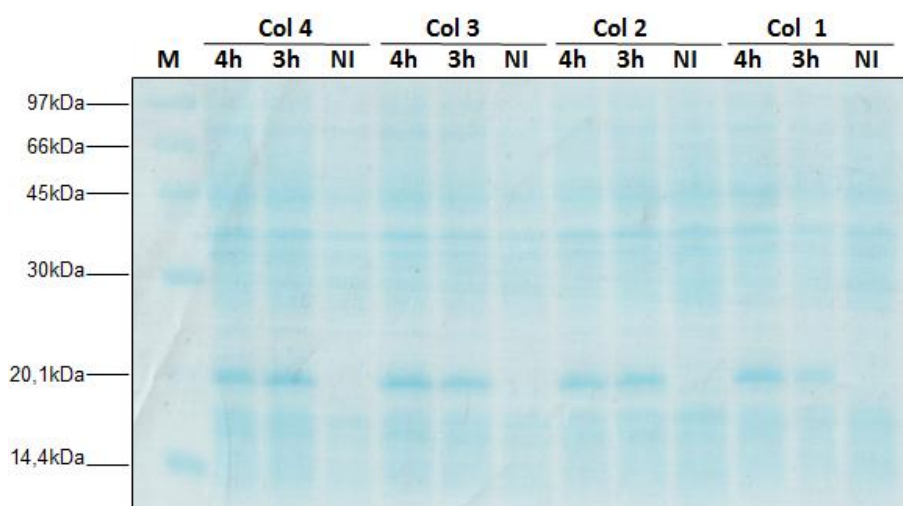


FIGURA 18- EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 EM QUATRO COLÔNIAS DIFERENTES DE *E. coli*.

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% de quatro colônias bacterianas distintas expressando ou não a porção extracelular de CD28.

LEGENDA: Os resultados representam a indução das colônias por 3 horas e 4 horas com 1mM de IPTG (linha 3h e 4h, respectivamente), assim como as colônias não induzidas (linha NI). M: LMW-SDS marker kit.

Pela figura 18 é possível verificar que a expressão da porção extracelular de CD28 foi muito eficiente, tendo em vista que esse polipeptídeo apresenta uma massa molecular prevista de 20 kDa. Apesar das quatro colônias de bactérias expressarem bem a proteína, optou-se por utilizar a colônia 4 nas próximas etapas, uma vez que a expressão tanto em 3 horas quanto em 4 horas é bastante similar, de modo que induzir a expressão protéica nessas bactérias por 3 horas será suficiente. Além disso, em ambos os tempos de indução se observa uma diferença significativa em relação às células não induzidas, que não expressam a proteína de interesse.

Estabelecidos os parâmetros de expressão da porção extracelular de CD28 em bactérias, foi feita uma expressão em larga escala baseada em tais parâmetros. Após lise por cisalhamento, foi feita uma análise da presença de proteína no lisado celular, cujo resultado encontra-se na figura 19.

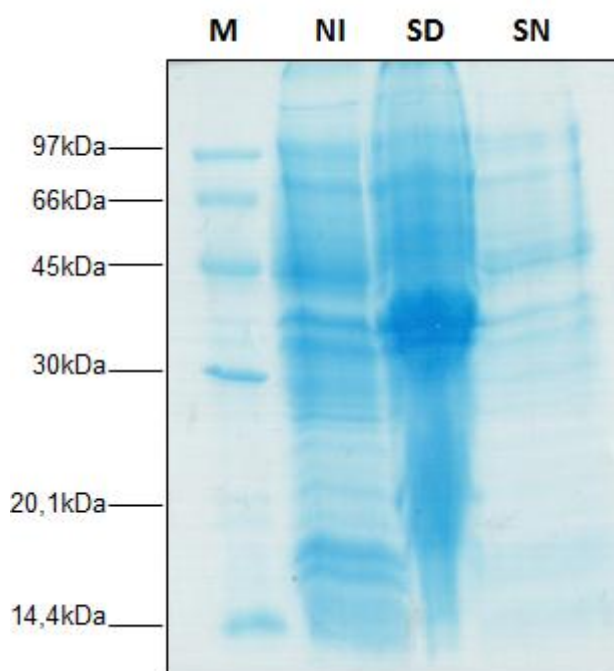


FIGURA 19- ANÁLISE DO LISADO DE CÉLULAS BACTERIANAS EXPRESSANDO A PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% de bactérias expressando CD28 após lise mecânica em prensa de French.

LEGENDA: Análise das células não induzidas com IPTG (linha NI) , do sedimento do lisado das células (linha SD), e do sobrenadante do lisado (linha SN). M: LMW-SDS marker kit

Analisando-se o lisado das células bacterianas, pode-se verificar que no sobrenadante não há proteína na altura da porção extracelular de CD28, que seria em 20 kDa, apesar de haver outras proteínas em diferentes alturas. Entretanto, no sedimento do lisado há uma quantidade bastante grande de diversas proteínas, inclusive na altura de 20 kDa, formando um rastro de proteínas. Apesar do excesso proteico, fica claro que a porção extracelular de CD28 está sendo expressa em corpos de inclusão, de modo que a proteína encontra-se no sedimento do lisado bacteriano.

Após a expressão em larga escala da porção extracelular de CD28, foi feita a sua purificação. Como a proteína foi expressa em corpos de inclusão, foi necessária sua solubilização com agente caotrópico, no caso a uréia, para então ser feita a purificação da proteína. O resultado da solubilização encontra-se na figura 20.

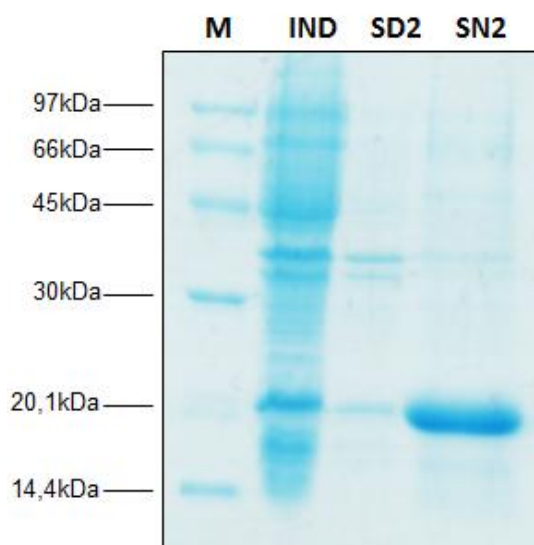


FIGURA 20- ANÁLISE DA SOLUBILIZAÇÃO COM AGENTE CAOTRÓPICO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 EXPRESSA EM BACTÉRIAS

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% do produto obtido pela solubilização do CD28 usando tampão de lise desnaturante com ureia.

LEGENDA: Extrato de bactérias induzidas com IPTG (linha IND) como referência da migração eletroforética do CD28, o sedimento do produto solubilizado com agente caotrópico (linha SD2) e o sobrenadante dessa solubilização (linha SN2). M: LMW-SDS marker kit

Pela figura 20 é evidente a solubilização adequada da porção extracelular de CD28 expressa em bactérias, pois o sobrenadante do lisado (linha SN2) possui uma banda bastante significativa de CD28 na altura esperada de 20 kDa, coerente com a

altura do CD28 no extrato de bactérias induzidas com IPTG. Além disso, o sedimento apresenta um resquício de CD28 não solubilizado, mas muito insignificante se comparado à proteína solubilizada presente no sobrenadante. Outra vantagem da solubilização, é que se pode verificar que a quantidade de CD28 em relação às demais proteínas é muito maior, o que pode facilitar a purificação da proteína, já que há menor número de contaminantes do que se observa no extrato de bactérias induzidas, por exemplo. Desse modo, foi feita a purificação do CD28 usando-se esse produto solubilizado com uréia, cujo resultado encontra-se na figura 21.

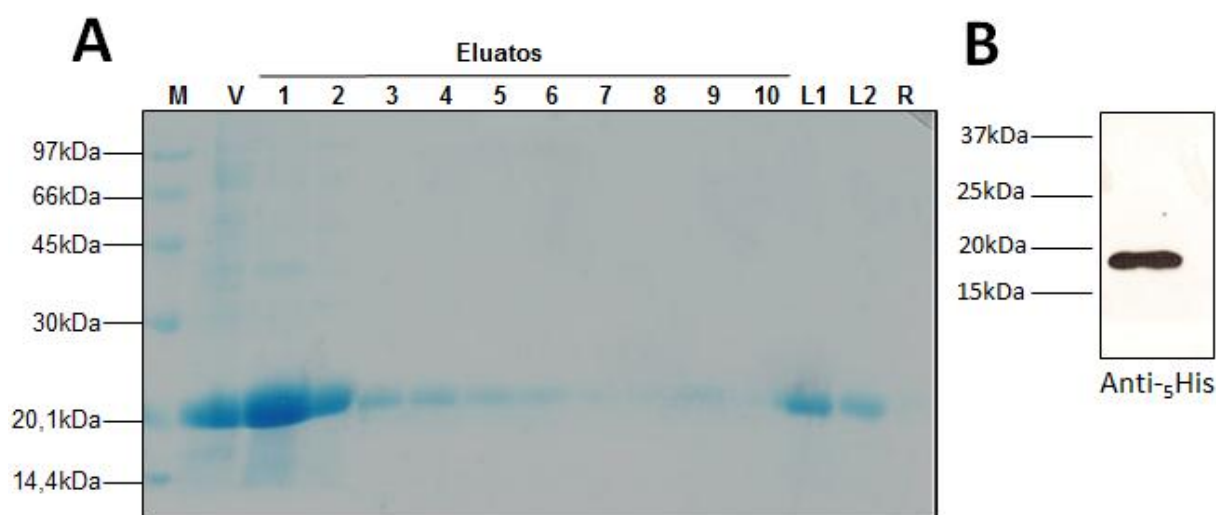


FIGURA 21- Purificação da porção extracelular de CD28 expresso em bactérias
FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: A) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% da purificação de CD28. Produto não ligado a resina (linha V) e os eluatos (linhas 1 a 10) apresentam o resultado da purificação. As linhas L1 e L2 são os tampões de lavagem após passagem na resina, e representam produtos que foram lavados em concentração mais baixa de imidazol que os eluatos (40mM e 300mM, respectivamente). Após a eluição, a resina foi analisada para verificar residuais de CD28. M: LMW-SDS marker kit B) Reação de *western blotting* para confirmar se a proteína purificada é de fato a porção extracelular de CD28, usando-se anticorpo que reconhece a sequencias de histidinas expressas pelo vetor. Marcador usado: Kaleidoscope Prestained Standards.

Pelo perfil eletroforético, verifica-se que há bastante proteína que não se ligou a resina de níquel, uma vez que há um banda significativa de proteína em cerca de 20 kDa na fração que não ligou na resina (linha V). Além disso, há também quantidade razoável de proteína que se desligou da resina com o tampão de lavagem. Esses podem ser indícios de que a proteína é facilmente eluída da resina em concentrações menores de imidazol, como 40 mM. Entretanto, a eluição com os

300 mM de imidazol foi eficiente na remoção de quase toda a proteína da resina, pois há um residual muito pequeno de CD28 ainda imobilizado na coluna (linha R). De maneira geral, os 10 eluatos e os tampões de lavagem podem ser usados como proteína purificada, com o CD28 bem visível e com baixo nível de contaminantes residuais (eluatos 1 e 2) e totalmente puro nos demais eluatos e nas lavagens.

Ao se reagir um eluato com anticorpo reativo para a cauda de histidinas (figura 21, quadro B) verificou-se que a proteína purificada de fato contém essa sequência de aminoácidos. Considerando-se a massa da proteína obtida, e a presença dessa cauda de histidinas, pode-se confirmar que a proteína obtida na purificação é a porção extracelular de CD28.

4.4 EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1(-)6His

A glicoproteína CD28 clonada em pcDNA3.1(-)6His teve sua expressão analisada por *Western blotting*. A expressão da proteína em células HEK293T foi feita usando-se o método de transfecção com cloreto de cálcio, e o resultado obtido encontra-se na figura 22.

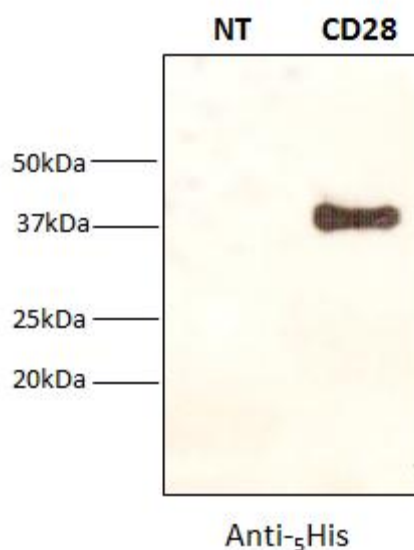


FIGURA 22- EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 EM CÉLULAS HUMANAS HEK293T

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Extrato de células HEK293T reagido com anticorpo reativo para a cauda de seis histidinas para confirmar a expressão da proteína por ensaio de western blotting.

LEGENDA: Análise usando 60 µg de extrato de células HEK293T não transfectada (linha NT), e 60µg de extrato dessas células transfectadas com pcDNA3.1(-)6His-CD28 (linha CD28). Reação feita com anticorpo anti-₅His. Marcador usado: Kaleidoscope Prestained Standards

Essa reação evidencia a adequada expressão do CD28 nas células HEK293T, uma vez que o anticorpo detecta uma banda de proteína na massa esperada, que varia de 29 a 40 kDa dependendo das glicosilações feitas. O controle negativo, usando extrato de células não transfectadas, indica que o anticorpo não reconhece proteína das células HEK293T, o que poderia acarretar um resultado falso positivo.

Para outra análise, foi feita a expressão do CD28 clonado em células síbias COS-7, usando-se o método da transfecção por lipofectamina. A figura 23 apresenta os resultados obtidos.

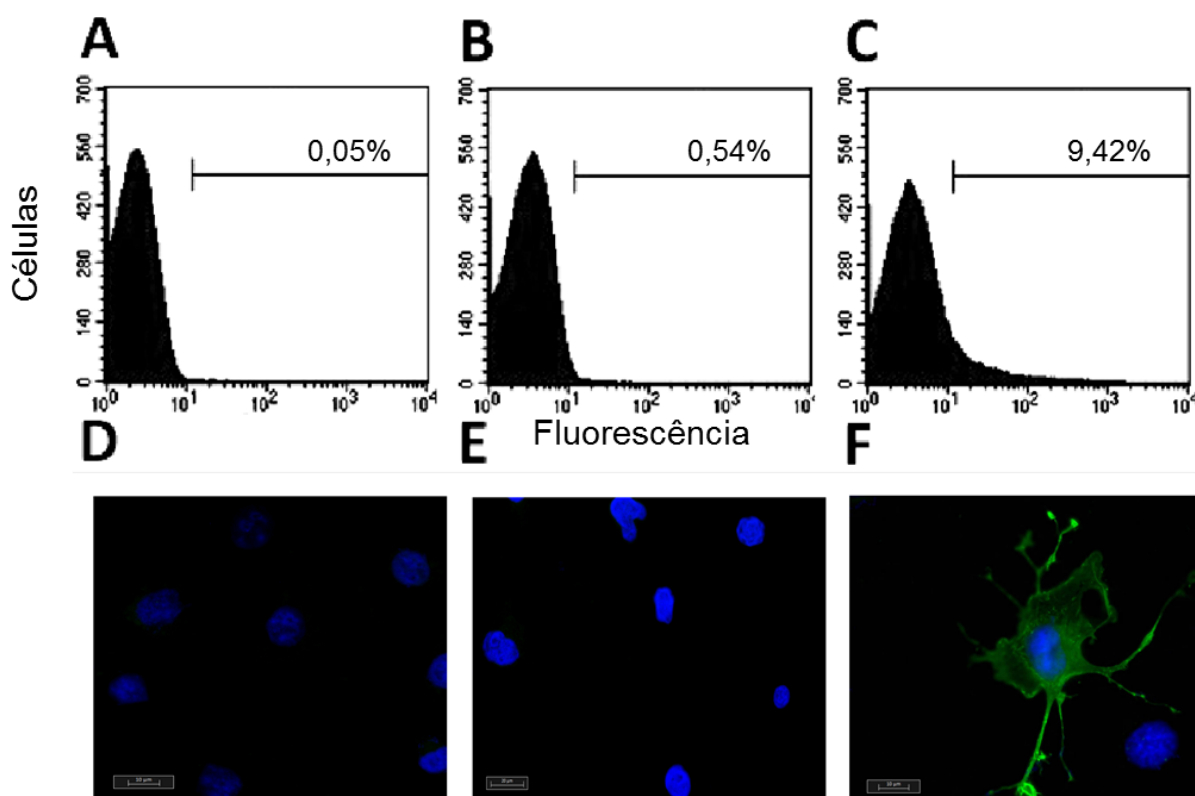


FIGURA 23- EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA CD28 EM CÉLULAS SÍMIAS COS-7

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Células transfectadas com pcDNA3.1(-)6His-CD28 indicando a expressão da proteína na membrana celular.

LEGENDA: A) Citometria de fluxo usando células COS-7 não transfectadas, B) Citometria de fluxo usando células COS-7 não transfectadas incubadas com o anticorpo comercial reativo a CD28, C) Citometria de fluxo usando células COS-7 expressando CD28 incubadas com o anticorpo anti-CD28, D) Imunofluorescência usando células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1(-), o vetor sem inserto E) Imunofluorescência usando células COS-7 não transfectadas, F) Imunofluorescência usando células COS-7 expressando CD28. Núcleo celular marcado com DAPI.

A figura 23 indica que as células COS-7 expressaram adequadamente a proteína CD28, pois é possível observar a proteína sendo expressa na superfície da célula transfectadas. Tanto no ensaio de imunofluorescência quanto no de citometria de fluxo as células não foram tratadas com permeabilizadores de membrana, de modo que o antígeno reconhecido pelos anticorpos encontra-se na porção externa da membrana celular, indicando o endereçamento correto da proteína no sistema heterólogo de expressão.

4.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA CD28 DE LINFÓCITOS DE AVES

A resposta imune dos animais foi avaliada por três metodologias diferentes: ELISA, *Western blotting* e citometria de fluxo.

Os soros hiperimunes dos animais dos grupos 1 e 2 foram primeiramente testados pelo imunoensaio ELISA, usando-se a metodologia de captura de anticorpo, a partir de adsorção do antígeno. Os resultados obtidos encontram-se na figura 24.

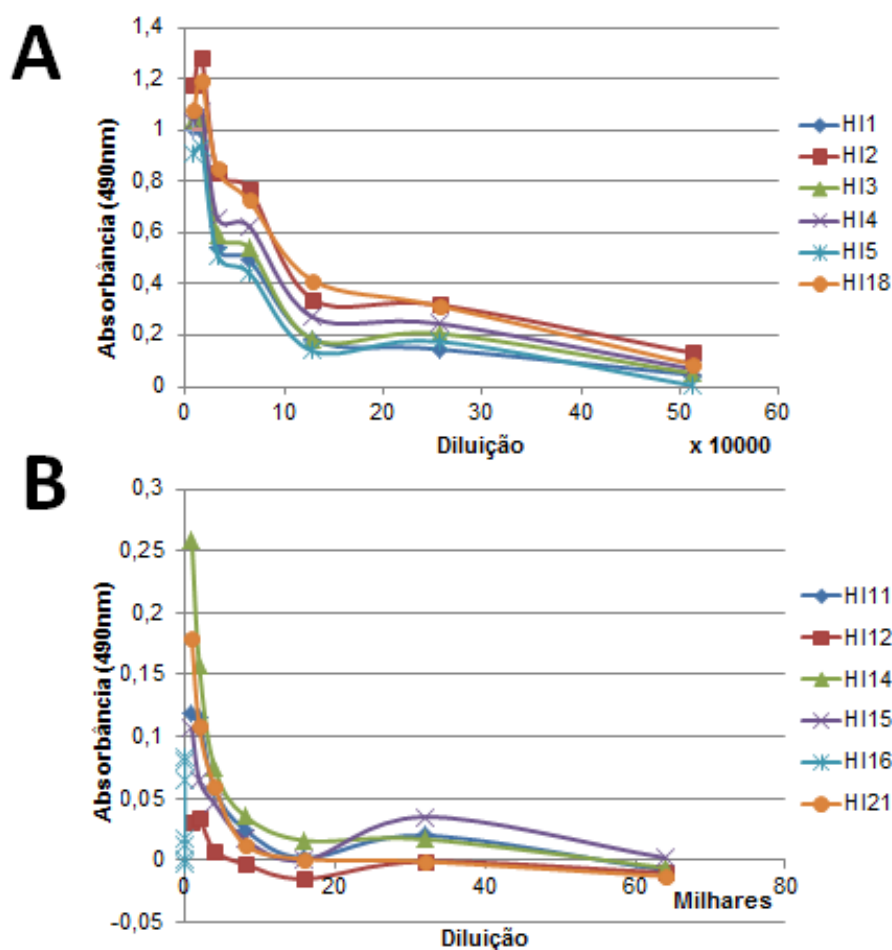


FIGURA 24- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE 12 CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM CD28 ATRAVÉS DE ELISA.

FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: Teste do soro hiperimune de camundongos imunizados com: A) porção extracelular de CD28 expresso em bactéria e purificada e B) com células HEK293T expressando CD28 em sua superfície.

Com a figura 24 observa-se que o título de anticorpos do soro dos camundongos do grupo 1, ou seja, imunizados com a porção extracelular de CD28, está bastante alto, chegando a perto de zero apenas quando diluído 512.000 vezes. Ainda nesse grupo, fica claro que os animais M2, M4 e M18 são os que apresentam maior título de anticorpos, e, portanto mais adequados a terem o baço fusionado com mieloma para obtenção de hibridomas.

Entretanto, os animais do grupo 2, imunizados com as células HEK293T expressando o CD28, quase não reagiram com o antígeno, apresentando um título baixo mesmo para diluições baixas do soro. De fato, descontando a absorvância do soro pré-imune, alguns animais ficaram com valores negativos de absorvância. O animal M13 morreu após a primeira imunização, por isso há um animal a menos.

Os soros hiperimunes dos animais dos grupos 1 e 2 também foram analisados por *Western blotting*. A figura 25 apresenta o resultado obtido.

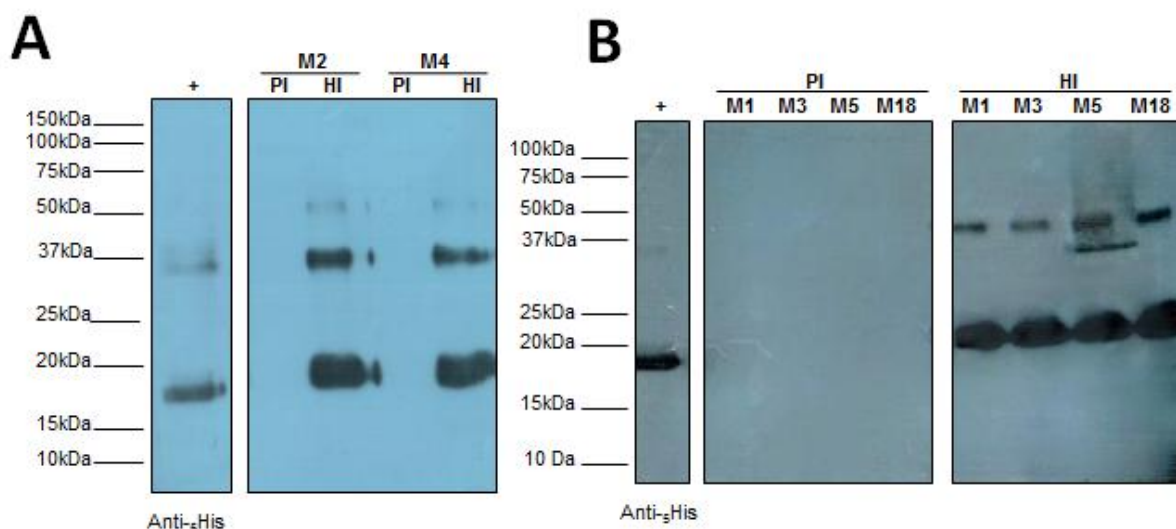


FIGURA 25- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 POR ENSAIO DE *WESTERN BLOT*TING.

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Porção extracelular de CD28 purificada e reagida com soro dos camundongos do grupo 1 na diluição de 1:10000.

LEGENDA: Seis animais testados (M1, M2, M3, M4, M5 e M18), reagindo-se tanto os soros pré-imunes (linhas PI) quanto os hiperimune (linhas HI). (A) Teste do soro dos animais M2 e M4, (B) Teste dos soros dos animais M1, M3, M5 e M18. Como controle positivo da reação (linha +) proteína CD28 reagida com anticorpo contra a cauda de seis histidinas. Marcador usado: Kaleidoscope Prestained Standards.

Os soros hiperimune dos seis animais do grupo 1 responderam adequadamente ao antígeno usado na imunização, apresentando bandas na altura esperada de 20kDa, e bandas de cerca de 40kDa, aparentemente dímeros de CD28, uma vez que também são reconhecidas pelo anticorpo contra a cauda de histidinas. Os soros pré-imune, em contrapartida, não reconheceram a proteína, resultado esperado uma vez que são soros cuja coleta precedeu a imunização dos animais. Além disso, é importante destacar que os soros foram diluídos 1:10.000 para serem reagidos, de modo que o título de anticorpos nesses soros parece ser bastante elevado.

Testar os soros contra a mesma proteína usada na imunização não fornece uma informação completa dos anticorpos obtidos, e por isso foi feita a reação usando soro dos animais contra extrato de células HEK293T expressando CD28. Essa é uma condição na qual a proteína recebe modificações pós-traducionais que a aproximam da molécula endógena expressa em linfócitos de galinha.

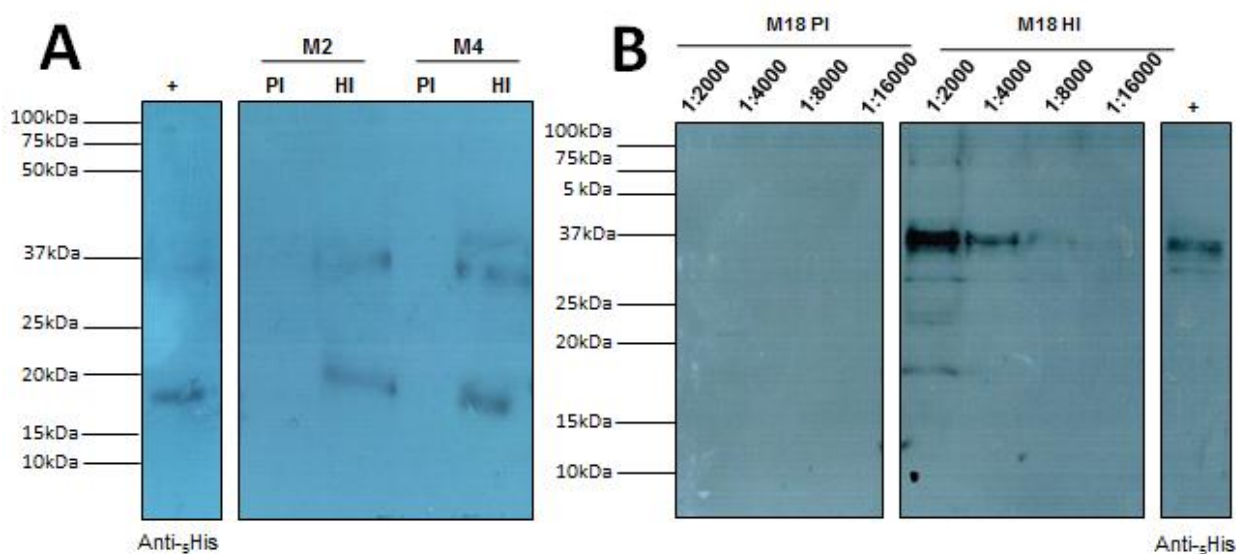


FIGURA 26- Análise da resposta imune de camundongos imunizados com a porção extracelular de CD28 por ensaio de *Western blotting*

FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: Extrato de células HEK293T expressando CD28 reagido com soro dos camundongos do grupo 1 na diluição de 1:10000 (quadro A) e diluições de 1:2000 até 1:16000 (quadro B). Três animais testados (M2, M4, e M18), reagindo-se tanto os soros pré-ímmunes (linhas PI) quanto os hiperimune (linhas HI). Como controle positivo da reação (linha +) proteína CD28 e extrato de HEK293T expressando CD28 (quadro A) e apenas extrato de HEK293T expressando CD28 (quadro B) reagidas com anticorpo contra a cauda de seis histidinas. Marcador usado: Kaleidoscope Prestained Standards

Pela figura 26, verifica-se que todos os animais apresentam anticorpos reativos contra a proteína CD28 inteira e glicosilada expressa em células de mamífero, com altura entre 29 e 40 kDa. Entretanto, em alguns animais, como o M2 e M4, visualiza-se uma banda na altura de 20 kDa, podendo indicar produto de degradação proteica ou ser um antígeno das células HEK293T reconhecido de forma inespecífica. Há também a possibilidade desta proteína ser uma forma imatura de CD28.

Quanto aos animais do grupo 2, não houve reação contra as proteínas expressas em bactéria pela reação de *western blotting*. Juntamente com o resultado obtido no ensaio de ELISA, pode-se inferir que esse protocolo de imunização não foi satisfatório, pois não gerou um título de anticorpos reativos desejado.

Por fim, realizou-se a análise por citometria de fluxo, usando-se células mononucleares do sangue periférico de galinha para testar os anticorpos policlonais. Essa é uma análise importante, pois os anticorpos são testados contra a proteína na sua forma nativa. A figura 27 mostra o resultado obtido.

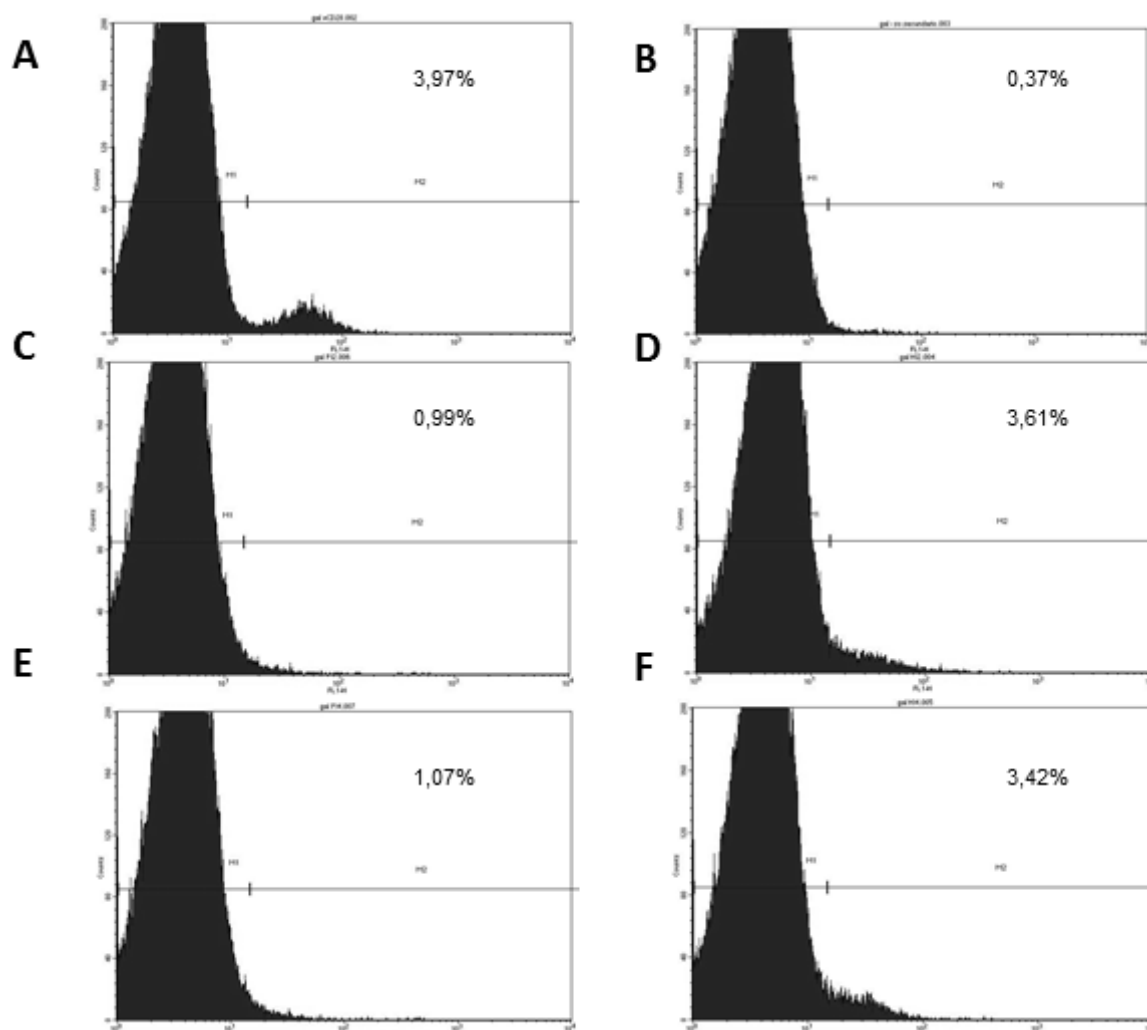


FIGURA 27- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28 POR CITOMETRIA DE FLUXO

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Células mononucleares de sangue periférico de galinha reagidas com soros policlonais.

LEGENDA: A) Controle positivo usando-se anticorpo comercial contra CD28 de linfócitos de galinha, B) Controle negativo reagindo-se as células apenas com o anticorpo secundário, C) Soro pré-imune do animal M2, D) Soro hiperimune do animal M2, E) Soro pré-imunes do animal M4, F) Soro hiperimune do animal M4. Os valores percentuais de cada quadrante indicam o percentual de células marcadas positivamente dentro da população selecionada.

Esse resultado mostra o reconhecimento do CD28 da superfície de linfócitos T de aves pelos soros hiperimune dos camundongos. Apesar do perfil de reconhecimento não ser idêntico ao do anticorpo comercial, o percentual de células marcadas é muito similar.

4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA CD28 DE LINFÓCITOS DE AVES

Uma vez comprovada a eficiência das imunizações através da validação do soro policlonal produzido pelos animais, prosseguiu-se com o processo de produção de anticorpos monoclonais. Para isso, o baço dos animais M2 e M4 foram fusionados com células mieloides para obtenção dos hibridomas.

Obtidos os hibridomas, foi feita a varredura para se determinar quais células secretavam anticorpos reativos a CD28. Para isso, empregou-se a técnica de ELISA, com a qual encontraram-se 430 colônias de células secretoras de anticorpos, dentre as quais 42 foram selecionadas, indicadas na figura 28.

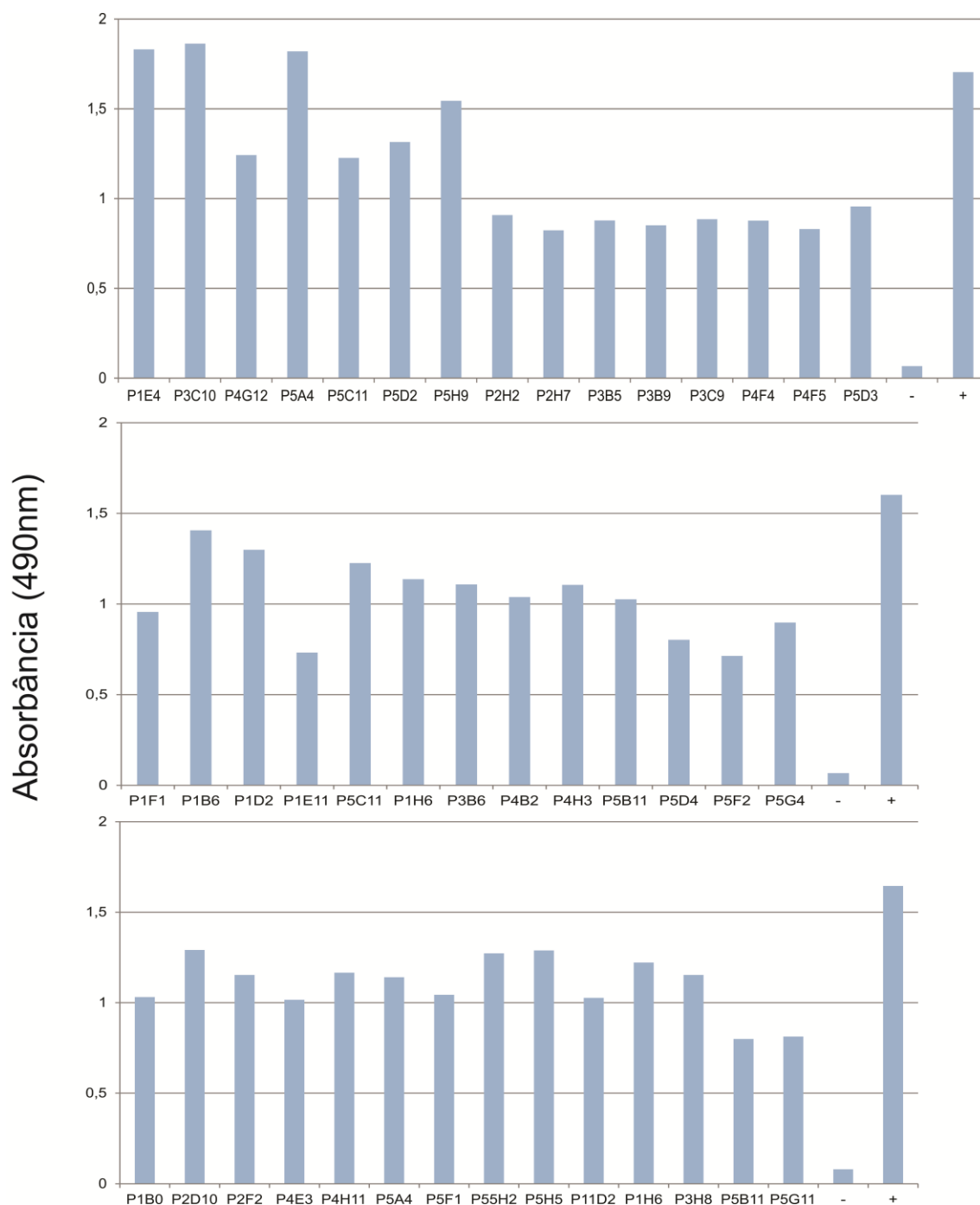


FIGURA 28- VARREDURA DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS POR IMUNOENSAIO ELISA

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sobrenadante de hibridomas testados por ELISA de captura de anticorpo, usando-se a porção extracelular de CD28 de galinha como antígeno.

LEGENDA: Controle negativo (linha -) foi feito com meio de cultivo dos hibridomas, e o controle positivo (linha +) foi feito com anticorpo policlonal murino.

Observa-se uma grande variação na absorbância das colônias, sendo que algumas apresentam uma reação mais forte que a observada com o soro hiperimune (controle positivo). Essas colônias foram submetidas ao procedimento de diluição limitante, para garantir que o hibridoma se originou de uma única célula secretora de anticorpo, de modo a ser produzido anticorpo monoclonal reativo a CD28.

Após a diluição limitante, 34 clones bem isolados por inspeção em microscopia óptica e positivos por ELISA foram encontrados. Esses clones sofreram nova diluição limitante e 24 clones também bem isolados e positivos por ELISA foram obtidos. Desses, foi selecionado o clone para a caracterização do anticorpo monoclonal obtido, denominado 534D10. Como este clone se mostrou estável ao congelamento e a sucessíveis repiques em cultivo foi submetido a diversos imunoenaios, com a finalidade de caracterizar o anticorpo monoclonal secretado por ele.

Ensaio de *western blotting* foi realizado com o sobrenadante do hibridoma 534D10 usando como fonte de amostra a proteína recombinante purificada a partir da expressão feita em *E. coli* e extrato de células HEK transfectada com a construção pcDNA3.1(-)6His-CD28.

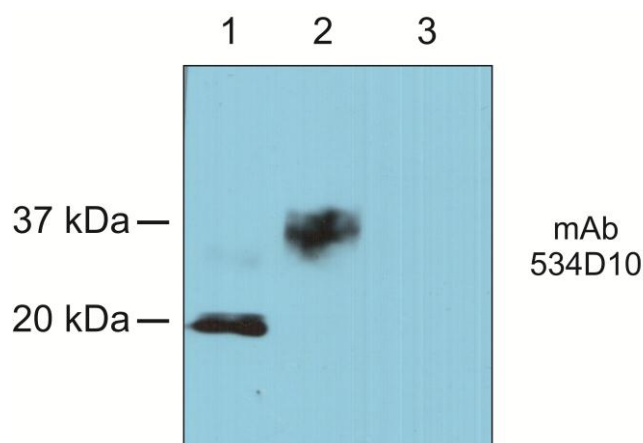


FIGURA 29- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE *WESTERN BLOTTING*

FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: Sobrenadante de hibridoma reagido com a porção extracelular de CD28 (linha 1) expressa em bactéria e purificada por IMAC, com a proteína inteira expressa em células humanas HEK293T (linha 2). Como controle negativo da reação foi usado extrato de células HEK293T que não foram transfectadas com pcDNA3.1(-)6His-CD28.

Pela reação da figura 29, fica claro que o mAb obtido é capaz de reconhecer por *western blotting* tanto a proteína expressa em bactéria, quanto a forma inteira e glicosilada de CD28 expressa em células humanas.

Com intuito de verificar se o anticorpo monoclonal seria capaz de reconhecer a proteína CD28 endógena expressa em PBMC de galinha, foi feito um ensaio de citometria de fluxo. Os resultados obtidos estão representados na figura 30.

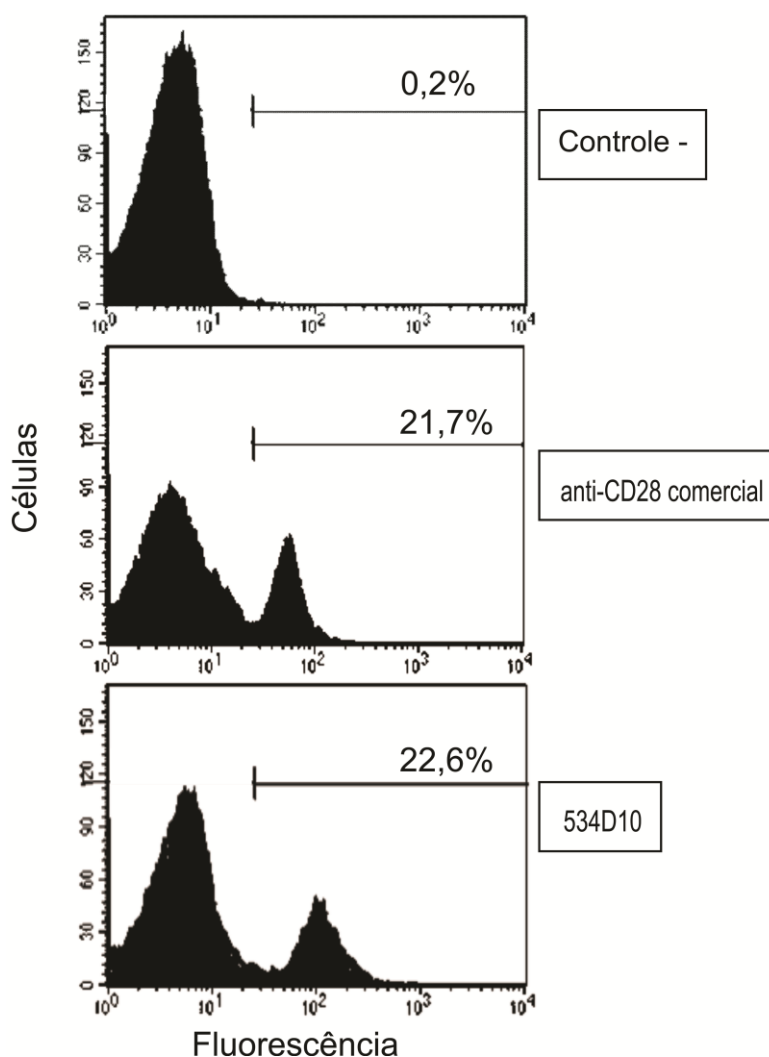


FIGURA 30- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sobrenadante de hibridoma testado em PBMC de galinha.

LEGENDA: O meio de cultivo do hibridoma foi usado como controle negativo (controle -), e anticorpo comercial anti-CD28 foi usado para análise comparativa da reação (anti-CD28 comercial) com o anticorpo monoclonal testado (534D10).

Esse resultado mostra que foi obtido um anticorpo adequado para uso em citometria de fluxo, pois tanto o padrão de marcação quanto a quantidade de células marcadas é similar aquele visto para o anticorpo comercial.

Outro ensaio feito com o mAb foi a imunofluorescência usando células COS-7 expressando CD28 de galinha.

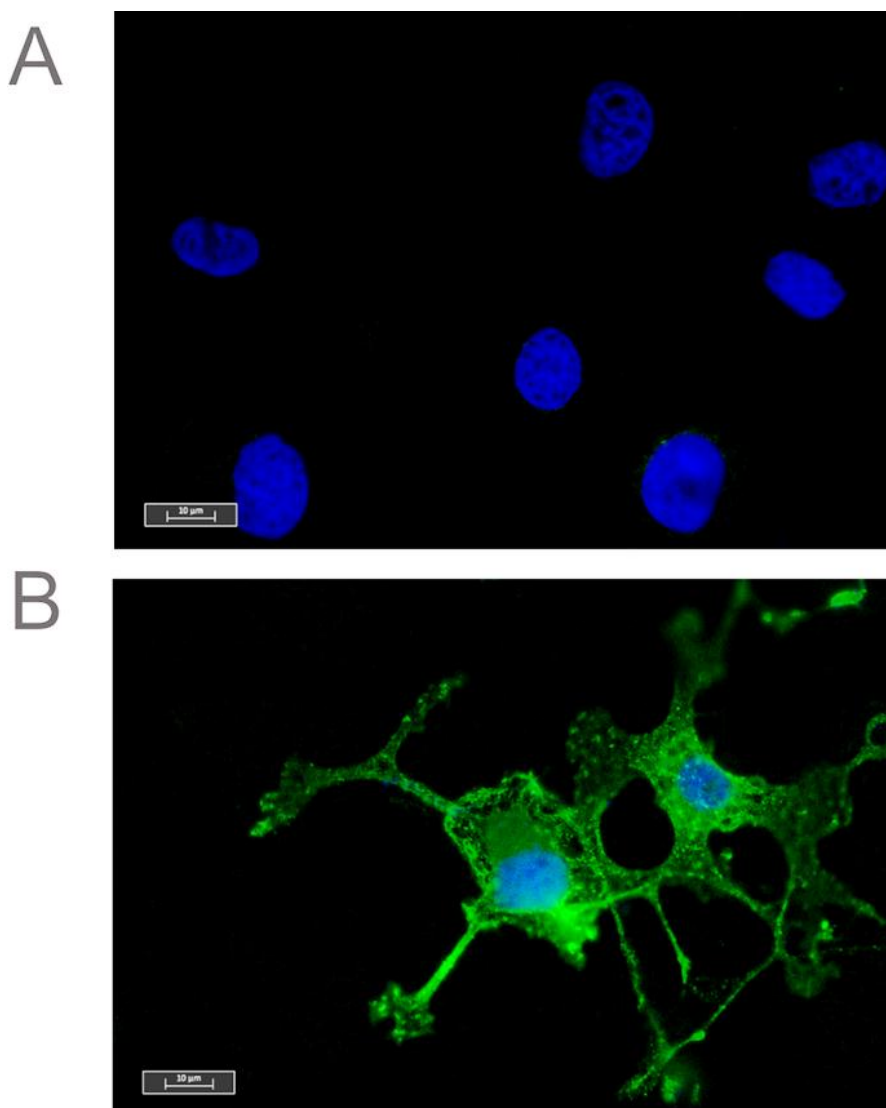


FIGURA 31- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

FONTE: O autor (2012).

LEGENDA: Sobrenadante de hibridoma testado em células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1(-)6His-CD28 (imagem B). Células não transfectadas (imagem A) foram usadas como controle.

O anticorpo monoclonal obtido, além de funcional em todos os imunoensaaios antes descritos, também é capaz de reconhecer a proteína CD28 expressa em

células de macaco por imunofluorescência, conforme visto na figura 31. A ausência de marcação nas células não transfectadas evidencia que o anticorpo não faz reação cruzada com nenhum antígeno da superfície das células COS-7, porém é capaz de reconhecer o CD28 expresso em toda a membrana celular.

Outro ensaio foi feito para confirmar a capacidade do mAb de reconhecer a proteína nativa expressa em linfócitos T. Para isso, foi feita uma imunoprecipitação, usando-se extrato de células mononucleares de galinha e resina com proteína A/G, capazes de interagir com a porção Fc dos anticorpos.

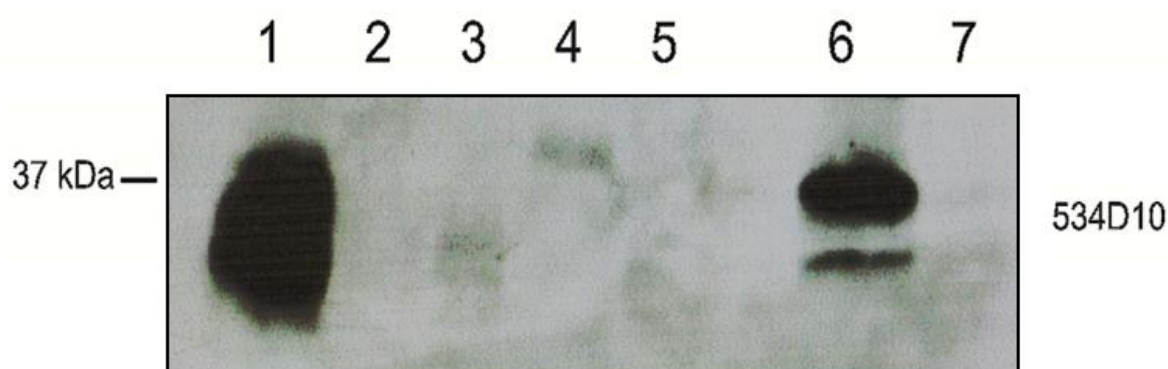


FIGURA 32- CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 534D10 REATIVO A CD28 DE GALINHA EM ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sobrenadante de hibridoma testado em imunoprecipitação de extrato de PBMC.

LEGENDA: A linha 1 corresponde a amostra de extrato de HEK293T expressando CD28 usado como controle positivo. Extrato de PBMC (linha 2) e o mesmo extrato após a etapa de clareamento (linha 3). A linha 4 representa o material ligado na resina controle, e a linha 5 o material que não se ligou a tal resina. Já a linha 6 contém o material ligado na resina específica, e a linha 7 o material que não se ligou a mesma.

A imunoprecipitação do mAb parece ter sido eficiente, pois pode-se verificar a presença de uma banda de altura esperada, cerca de 37 kDa, no material que se ligou ao imunocomplexo (resina mais mAb). Verifica-se que o extrato total de PBMC não apresenta CD28 em quantidades suficientes para ser detectado pelo mAb sem a imunoprecipitação. Além disso, pelo resultado da linha 4 pode-se verificar que não houve precipitação da proteína na resina durante a incubação (linha 4), de modo que a banda observada na linha 6 foi de fato imunoprecipitada.

4.7. ENSAIO DE LIGAÇÃO DE CD28 RECOMBINANTE COM MACRÓFAGOS DE GALINHA

Um ensaio de ligação de CD28 recombinante com macrófagos de galinha foi realizado com intuito de verificar se a proteína recombinante expressa em bactéria era capaz de ligar aos seus receptores endógenos presentes na superfície de macrófagos de galinha. A figura 33 indica o resultado obtido.

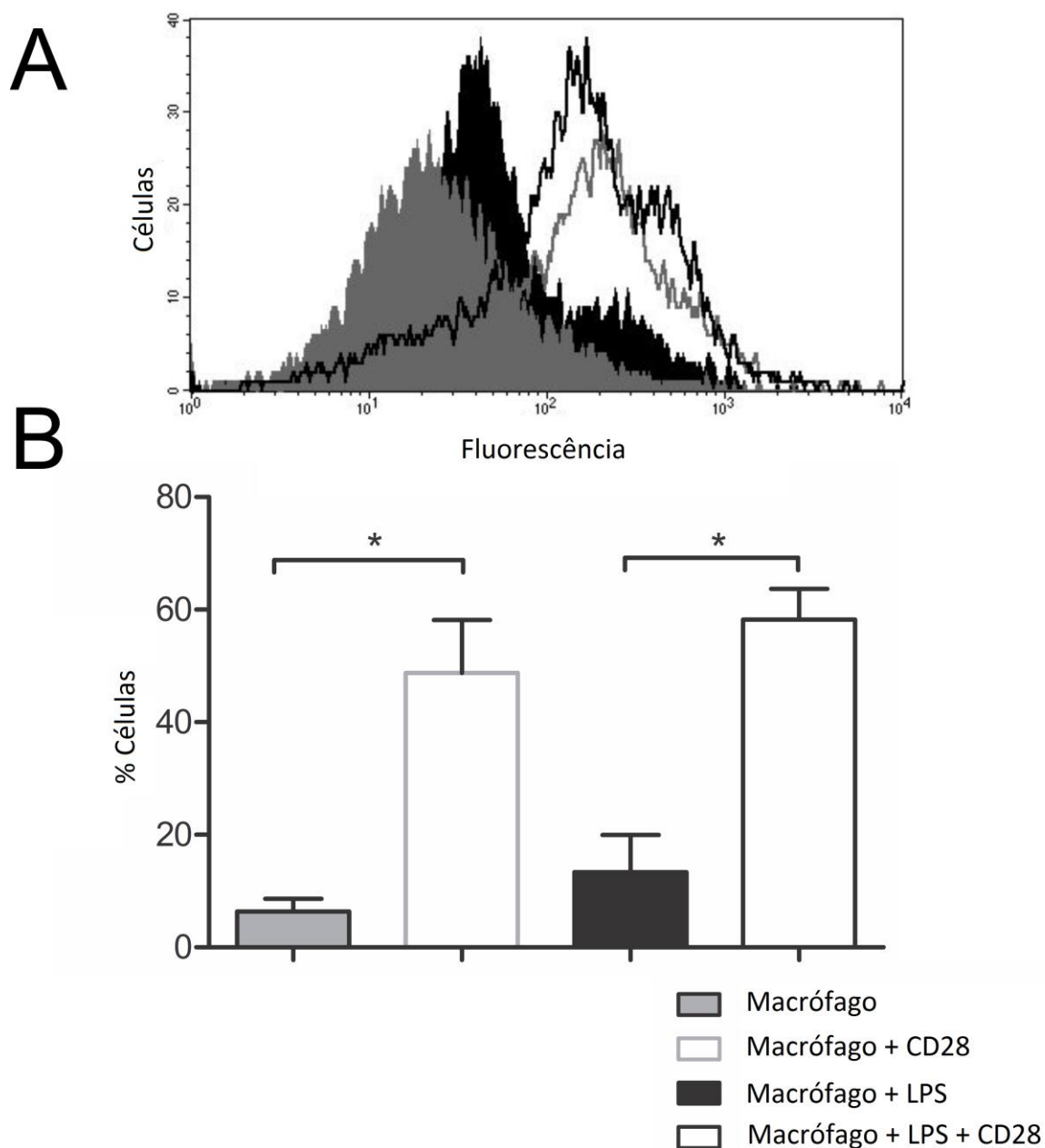


FIGURA 33- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A SEU RECEPTOR ENDÓGENO EXPRESSO EM MACRÓFAGOS DE GALINHA

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Análise da ligação de CD28 recombinante ao seus receptores expressos em macrófagos ativados ou não com LPS.

LEGENDA: (A) Histograma da citometria (B) Análise estatística no software GraphPad Prism. Análise por one-way ANOVA, com post-test Bonferroni. * $p < 0,01$.

A análise por citometria mostra deslocamento das populações controle, ou seja, reagidas apenas com o anti-CD28, quando há a incubação dos macrófagos com o CD28 recombinante. A análise estatística evidencia que há diferença

significativa (com $p < 0,01$) em relação ao macrófago não incubado e incubado com a proteína recombinante. Entretanto, a ativação do macrófago com LPS, usado por se saber da sua capacidade de aumentar a expressão de proteínas B7, não foi capaz de levar a um aumento significativo na quantidade de CD28 ligada ao macrófago.

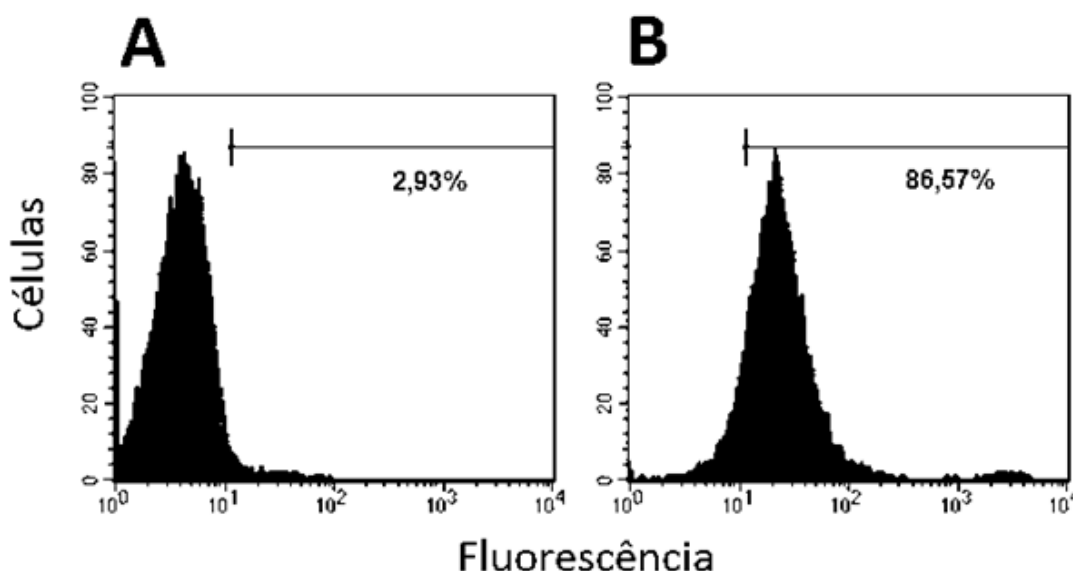


FIGURA 34- EXPRESSÃO DE MHC DE CLASSE II NOS MACRÓFAGOS PURIFICADOS PARA O ENSAIO DE LIGAÇÃO

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Marcação dos macrófagos isolados de sangue de galinha com MHC de classe II.

LEGENDA: (A) Macrófagos não reagidos com anticorpo, (B) Macrófagos reagidos com anti-MHC de classe II.

Pela figura observa-se que quase 90% das células usadas no ensaio de ligação são APCs, expressando MHC de classe II em sua superfície. Apesar desse controle não garantir que de fato trabalhamos com macrófagos, garante que quase a totalidade das células deve apresentar CD80 e CD86, foco do ensaio de ligação.

5 DISCUSSÃO

5.1 CLONAGEM DE CD28

Após a clonagem da porção extracelular de CD28 em pET28a(+) foi feita uma PCR de colônia para verificar a presença do inserto. Entretanto, verificou-se um grande numero de colônias sem o mesmo. Como o plasmídeo foi digerido com duas enzimas diferentes, é de se estranhar que o vetor possa ter circularizado sem inserto. É possível que as digestões com as enzimas *NheI* e *XhoI* não tenham tido uma eficiência de 100%, produzindo vetores digeridos com apenas uma das enzimas, capazes de circularizarem-se na reação com a T4 DNA ligase. Também é possível que essas colônias de fato não apresentem o plasmídeo, mas devido à proximidade a outras colônias elas tenham se beneficiado do crescimento alheio, de modo que o antibiótico seletivo naquela região foi degradado. Desse modo, decidiu-se avançar com algumas colônias positivas na PCR, obtendo-se um plasmídeo com a proteína adequadamente clonada, conforme visto na reação de sequenciamento.

Para a clonagem de toda a sequencia de CD28 em pcDNA3.1(-)6His, verificou-se na obtenção do inserto a presença de duas bandas, enquanto a PCR piloto usada para padronizar a reação apresentou banda única na altura esperada de 693pb. Essa divergência pode ser devido ao fato do cDNA utilizado não ser o mesmo, mas sim de lotes diferentes. Como esse cDNA é obtido a partir de células mononucleares do sangue, um lote diferente implica em animal diferente, e extração de RNA e síntese de cDNA diferentes, e tudo isso pode acarretar na obtenção de um cDNA degradado e até mesmo menos puro que o usado anteriormente. Sabe-se que contaminantes nas reações de PCR não só diminuem a eficiência, como implicam no uso de menor quantidade do DNA molde de interesse, o que pode culminar na geração de produtos inespecíficos (AUSUBEL *et al.*, 2005). Porém, cortando-se a banda de interesse, foi possível gerar um plasmídeo com a clonagem adequada de CD28, conforme visto no sequenciamento de DNA.

5.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE CD28

A expressão da porção extracelular de CD28 em bactérias ocorreu em corpos de inclusão. Analisando-se o lisado das células bacterianas, pode-se verificar que no sobrenadante não há a proteína, enquanto no sedimento do lisado há uma quantidade bastante grande de diversas proteínas, inclusive na altura de 20kDa. A proteína expressa é considerada hidrofílica, pois analisando-se sua sequência com o software "ProtParam", da ExPASy Bioinformatics Resoucer Portal, verifica-se que seu índice GRAVY (Grand Average Hydropathicity) é de -0,596. Esse índice é calculado pela soma dos valores de hidrofobicidade dos aminoácidos da cadeia polipeptídica dividido pelo número de resíduos de aminoácidos dessa cadeia. Quanto mais positivo o GRAVY, maior a hidrofobicidade da cadeia, e quanto mais negativo maior a hidrofiliidade (KYTE *et al.*, 1982).

Apesar da proteína expressa ser considerada hidrofílica, observa-se que a sua expressão ocorreu como corpos de inclusão. Isso era de certa forma esperado tendo-se em vista que a porção extracelular de CD28 é altamente glicosilada em eucariotos, o que justifica sua hidrofiliidade predita devido ao grande número de grupos hidroxila da molécula. Entretanto, a expressão em bactérias não leva a tais modificações pós-traducionais o que pode culminar na produção de uma cadeia de aminoácidos pouco solúveis. É importante considerar também que as células bacterianas foram levadas a expressar uma proteína exógena em grandes quantidades, e esse processo comumente leva a produção de proteínas que precipitam na forma desses agregados insolúveis. De fato, a expressão de proteínas em corpos de inclusão é mais uma regra do que uma exceção, quando se tratando do sistema de expressão em *E. coli*. (AUSUBEL *et al.*, 2005; RUDOLPH *et al.*, 1996).

Uma maneira de se contornar a questão dos corpos de inclusão inclui a co-expressão de chaperonas moleculares. As chaperonas moleculares são proteínas envolvidas em diferentes processos, desde o enovelamento de polipeptídeos recém sintetizados e re-enovelamento de proteínas desnaturadas ou de agregados protéicos, até a translocação de proteínas pelas membranas celulares e prevenção da formação de agregado protéico. Elas atuam através da interação com resíduos hidrofóbicos expostos nas proteínas não enoveladas ou parcialmente enoveladas,

bloqueando interações entre moléculas através desses sítios hidrofóbicos (SUGIMOTO *et al.*, 2008). Entretanto, essa co-expressão não é uma metodologia muito utilizada devido aos seus resultados negativos. Deve-se considerar que o enovelamento de proteínas com pontes dissulfeto é um processo oxidativo, que deve ser comprometido quando no ambiente redutor do citosol. Além disso, o enovelamento protéico é muitas vezes realizado em conjunto pelos diversos membros das chaperonas (RUDOLPH *et al.*, 1996). Portanto, mais simples do que se alterar a metodologia de expressão para uma que pode contornar o problema mas não garante a eficiência da expressão é trabalhar com a solubilização dos agregados proteicos.

Apesar de não haver estudos da expressão e purificação de CD28 de galinha, alguns de seus parceiros moleculares já foram descritos. A expressão de CD86 humano também foi feita em sistema heterólogo de *E. coli*, e similarmente ao CD28 essa proteína foi expressa em corpos de inclusão. Assim como foi feito para o CD28, o CD86 humano foi solubilizado a partir de seus agregados usando-se agente caotrópico, nesse caso 6 M de hidrocloreto de guanidina (ZHANG *et al.*, 2002). Já a expressão de CTLA-4 suíno foi feita em células eucarióticas de leveduras, a *Pichia pastoris*, um modelo que, diferentemente das bactérias, é capaz de realizar modificações pós-traducionais na molécula. Para o CTLA-4 a expressão em leveduras levou a uma proteína solúvel, assim como observado para o CD28 de galinha quando expresso em células humanas (PERAINO *et al.*, 2012).

A expressão da proteína em corpos de inclusão pode não ser de todo um problema. Esses agregados parecem ser bastante homogêneos e formados principalmente pelo produto superexpresso, a proteína recombinante (VENTURA *et al.*, 2006). Conforme observado na purificação do CD28 de galinha, a formação de corpos de inclusão pode ser considerada como uma etapa bastante inicial de purificação, separando o produto de interesse de outros contaminantes solúveis. Na figura 20 fica claro que o material solubilizado dos corpos de inclusão possui uma quantidade muito menor de proteínas que o CD28 do que o extrato de células induzidas. Além disso, a expressão de proteínas recombinantes em corpos de inclusão pode proteger o produto de degradação proteolítica. Entretanto, cuidados devem ser tomados quanto a função biológica esperada para a proteína expressa, muitas vezes essas proteínas agregadas não possuem atividade biológica e necessitam de métodos elaborados de solubilização, purificação e redobrimento

para que a proteína possa ser recuperada, conforme feito para a expressão de CD86 humano (RUDOLPH *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2002).

Após a solubilização do CD28 a partir dos corpos de inclusão usando-se agente caotrópico, foi feita a purificação por IMAC, na qual se observa uma grande quantidade de CD28 no produto não ligado a resina durante a purificação. Como a resina usada apresenta uma capacidade de ligação de 50 mg de proteína/mL de resina (informações do fabricante– QIAGEN), e foram utilizados 500 µL, fica claro que a capacidade de ligação da resina não foi atingida, pois 25 mg de CD28 no lisado de bactérias é uma quantidade bastante alta. Portanto, pode-se descartar que havia presença de CD28 no produto não ligado a resina por exceder a capacidade de ligação da resina. Juntamente com o fato de haver proteína eluída nos tampões de lavagem, acredita-se que a porção extracelular de CD28 é facilmente eluída da resina em concentrações baixas de imidazol, podendo-se diminuir a exigência de ligação da resina e a concentração de imidazol para lavagem da resina e até para a eluição. Entretanto, essas alterações no protocolo não foram feitas, pois a pureza obtida foi satisfatória, além de se conseguir cerca de 4mg de proteína com 200 mL de cultura bacteriana, suficientes para a imunização dos animais, análise da resposta imune e varredura de hibridomas.

A expressão de CD28 em células HEK293T e COS-7 foi bastante eficiente. Na clonagem do CD28 em vetor de expressão eucarioto o peptídeo sinal de direcionamento foi amplificado com o restante da sequência, e foi eficiente no envio da proteína para a membrana celular. Sabe-se que o peptídeo sinal é muito importante no endereçamento e envio de proteínas a membrana celular, e apesar de sua sequência não ser totalmente conservada entre as espécies, ela compreende um grupo central de aminoácidos hidrofóbicos com preferência por alaninas ou leucinas (GIERASCH *et al.*, 1989; STROUD *et al.*, 1999). Assim, conforme observado na expressão de CD28, a clonagem da sequência sinal de uma proteína de galinha foi eficiente em outro organismo, como uma célula de mamífero, mesmo com a diferença entre os peptídeos sinais desses animais.

5.3. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A CD28

Após a imunização dos animais, verificou-se que todos os animais do grupo 1 apresentaram resposta contra o antígeno recombinante expresso em bactérias e purificado por IMAC (figura 24, ensaio de ELISA). Além disso, os anticorpos produzidos pelos animais deste grupo reagiram com a proteína CD28 expressa em células de mamífero (figura 26). Entretanto, o soro dos animais M2 e M4 reconheceu uma banda na altura de 20 kDa, podendo indicar produto de degradação proteica, um antígeno das células HEK293T reconhecido de forma inespecífica ou uma forma imatura de CD28 que ainda não sofreu todas as modificações pós-traducionais, pois a massa molecular mínima da proteína, ou seja, considerando-se apenas os aminoácidos, é de 29 kDa. O CD28 expresso em linfócitos T de galinha apresenta massa molecular do núcleo proteico de 25 kDa (ARSTILA *et al*, 1994), sendo essa diferença de 4 kDa referente a cauda de histidina e aminoácidos adicionados entre o sítio de inserção no plasmídeo. De fato, a hipótese da banda de 20 kDa ser produto de ação de massa do anticorpo pode ser confirmada pela reação com o soro hiperimune do animal M18 na diluição de 1:4000, na qual bandas inespecíficas que apareciam na diluição de 1:2000 deixam de aparecer, apesar do soro desse animal não reconhecer uma banda em 20kDa tão nítida quanto os animais M2 e M4. Os animais M3 e M5 foram deixados de lado, pois se considerando a resposta imune por *western blotting* e ELISA, os animais M2, M4 e M18 apresentaram soro com maior título.

Quanto aos animais do grupo 2, não houve resposta imune satisfatória. Isso pode ter ocorrido pelo fato de não haver CD28 nas células em quantidade suficiente para gerar anticorpos reativos. Além disso, algum produto das células HEK293T pode ter sido mais antigênico que o próprio CD28. Levando-se em consideração que uma proteína de galinha deve gerar uma resposta imune mais robusta, as células usadas nas imunizações podem ter apresentado uma proteína com potencial mais imunogênico, que por sua vez poderia levar ao direcionamento da resposta imune humoral do animal apenas para este antígeno.

De modo geral, a imunização de camundongos com a porção extracelular de CD28 foi eficiente, gerando soros hiperimune com alto título de anticorpo policlonais. Conforme esperado, a imunização com uma proteína de galinha em um

camundongo foi bastante efetiva, sendo a similaridade de aminoácidos entre CD28 murino e CD28 de galinha de 50% baixa o suficiente para o antígeno usado ser imunogênico. Além disso, verificou-se que mesmo utilizando um antígeno sem modificação pós-traducional, foram gerados anticorpos que reconhecem a proteína nativa expressa em linfócitos T de aves.

A geração de anticorpos monoclonais foi satisfatória, gerando um clone capaz de reconhecer a proteína CD28 em diversos imunoenaios. A imunoprecipitação do mAb, apesar de indicar um resultado positivo, ainda precisa ser feita usando-se um meio de cultivo do hibridoma ausente de soro bovino, pois as imunoglobulinas presentes nesse soro deixam a reação poluída e dificultam a visualização do resultado. Juntando-se o resultado do ensaio de citometria de fluxo usando PBMC e da imunoprecipitação, pode-se verificar que o mAb obtido é capaz de se ligar a proteína CD28 endógena expressa em células de galinha. Esse anticorpo pode ser usado em diferentes ensaios, permitindo o estudo da proteína CD28 e suas funções no sistema imune de galinha.

5.4. ENSAIO DE LIGAÇÃO DE CD28 RECOMBINANTE COM MACRÓFAGOS DE GALINHA

O ensaio de ligação mostrou que a proteína recombinante expressa em bactéria foi capaz de se ligar a estruturas na superfície de macrófagos de galinha. Sabe-se que em mamíferos o CD28 é uma proteína altamente glicosilada (WARD 1996), e como a proteína expressa em bactérias é uma proteína recombinante não glicosilada, decidiu-se verificar a capacidade dessa molécula de ser reconhecida por seus parceiros moleculares, CD80 e CD86 na superfície de APCs de galinha. Até este momento, não foi caracterizada a identidade do ligante de CD28 na superfície de macrófagos, porém pode-se especular que provavelmente o ligante pertença a família B7 (SHARPE *et al.*, 2002).

Por análise de citometria de fluxo verificou-se que macrófagos incubados com o CD28 recombinante apresentaram 40% de positividade quando reagidos com o anticorpo monoclonal contra CD28, enquanto os macrófagos não incubados com a

proteína apresentaram uma reatividade residual de apenas 6,9%. Já os macrófagos ativados com LPS apresentaram 54,7% de positividade quando incubados com CD28 recombinante, enquanto seu controle sem incubação com a proteína solúvel foi marcado em 13,7%. Essa diferença, entretanto, não é estatisticamente significativa, podendo ser devida a variações aleatórias, e não ao tratamento com LPS. É sabido que produtos bacterianos são capazes de aumentar a expressão de CD80 e CD86 em macrófagos (DING *et al.*, 1998), mas nos ensaios não foi possível verificar esse aumento de expressão através da análise indireta da ligação de CD28 às células.

Alguns estudos mostram que em monócitos humanos cultivados *in vitro* há aumento na expressão de CD80 e CD86. Nessas células, observou-se que para CD80 a estimulação com antígeno bacteriano aumenta a sua expressão mais eficientemente do que apenas o cultivo celular; entretanto a expressão de CD86 não sofre muita alteração quando há estimulação com produto bacteriano ou não, após 24 horas de cultivo *in vitro* (FLEISCHER *et al.*, 1996). Essa diferença está relacionada, provavelmente, com o fato de CD86 ser constitutivamente expresso em APC, diferentemente de CD80 cuja expressão é regulada pela ativação do sistema imune (ZHANG *et al.*, 2002). Propõe-se, portanto, que talvez os macrófagos utilizados em nosso estudo já estejam expressando no seu limite CD80 e, mais provavelmente, CD86, uma vez que ficam em cultivo por 4 dias, de modo que a ativação com LPS não foi capaz de aumentar essa expressão.

Sabe-se que a região responsável pela ligação de CD28 com membros da família B7 é o hexapeptídeo MYPPPY (COLLINS *et al.*, 2005; PARSONS *et al.*, 1996), e analisando-se as regiões preditas a receberem glicosilação pós-traducional verifica-se que esse hexapeptídeo e suas vizinhanças não são alvos dessas modificações. Juntos, os resultados sugerem que a glicosilação não interfere na ligação de CD28 com estruturas na proteína de macrófagos, e tanto CD80 quanto CD86 parecem estar envolvidos nesse mecanismo como receptores de CD28. Esse mecanismo é importante para elucidar se CD28 é capaz de transmitir sinal de ativação a APCs derivadas do sistema imune de aves, conforme já foi descrito para células dendríticas de camundongo (ORABONA *et al.*, 2004).

6 CONCLUSÕES

- Os iniciadores P1 e P2 foram adequados na amplificação e clonagem da porção extracelular de CD28 em vetor de expressão pET28a(+);
- Os iniciadores P3 e P4 foram adequados para a inserção da cauda de histidina no plasmídeo pcDNA3.1(-);
- Os iniciadores P5 e P6 foram adequados na amplificação e clonagem de toda a sequência de CD28 em vetor de expressão pcD3.1(-)6His;
- A expressão da porção extracelular de CD28 em bactérias gerou grandes quantidades da proteína em corpos de inclusão, facilmente purificada por IMAC;
- A proteína expressa em bactérias é capaz de se ligar a proteínas na superfície de macrófagos de galinha, provavelmente CD80/CD86;
- A expressão de CD28 em células de mamífero foi bastante eficiente e a proteína foi direcionada para a superfície celular ;
- O protocolo de imunização de camundongos com a porção extracelular de CD28 purificada foi eficiente em gerar soros hiperimune com alto título de anticorpos, estes capazes de reconhecer a proteína nativa;
- O protocolo de imunização de camundongos com as células HEK293T expressando CD28 não foi eficiente em gerar soros hiperimune com alto título de anticorpos;
- A fusão de células mielóides com células de baço de camundongos imunizados com a porção extracelular de CD28 gerou clones secretores de anticorpos;
- O anticorpo monoclonal obtido é capaz de reconhecer o CD28 endógeno em diferentes imunoenaios, como citometria de fluxo e imunoprecipitação, além de reconhecer a proteína recombinante por ELISA, *Western blotting* e imunofluorescência.

Em linhas gerais, esse trabalho desenvolveu uma metodologia para clonar, expressar e purificar CD28 de galinha a partir de células bacterianas. Essa proteína recombinante conserva sua habilidade de se ligar ao seu parceiro molecular na

superfície de macrófagos. Além disso, um novo anticorpo monoclonal reativo a CD28 foi produzido, capaz de reconhecer CD28 superexpresso em células de mamífero e a proteína nativa em linfócitos de galinha. Também mostramos que CD28 de galinha expresso em células de mamífero foi corretamente enviado a superfície celular, abrindo a possibilidade de se estudar CD28 em modelos mamíferos.

Todas as moléculas geradas podem ser exploradas como ferramentas moleculares para estudos do sistema imune aviário.

REFERÊNCIAS

ALARCÓN, B.; MESTRE, D.; MARTINEZ-MARTIN, N. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? **Immunology**, v.133, p.420–425, 2011.

ARSTILA, TP; VAINIO, O. Evolutionarily conserved function of CD28 in $\alpha\beta$ T cell activation. **Scandinavian journal of Immunology**, v. 40, p. 368–371, 1994.

AUSUBEL,FM; BRENT, R.; KINGSTON,R. E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A; STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology. **John Wiley & Sons. 2005.**

BEIRÃO, B. C. B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando Citometria de fluxo**. Dissertação (mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BOUR-JORDAN, H.; ESENSTEN,J. H.; MARTINEZ-LLORDELLA, M.; PENARANDA, C.; STUMPF, M.; BLUESTONE, J. A. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. **Immunology Reviews**, v. 241, n.1, p.180–205, 2012.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248–54, 1976.

BRIDLE, B. W.; JULIAN, R.; SHEWEN, P. E.; VAILLANCOURT, J. P.; KAUSHIK, A. K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, n.3, p.183-190, 2006.

CHEN, C; OKAYAMA, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. **Molecular and cellular biology**, v.7, n.8, p.2745–52, 1987.

COLLINS, M.; LING,V.;CARRENO, B. M. The B7 family of immune-regulatoryligands. **Genome biology**, v.6, n.6, p.223, 2005.

DING, L; SHEVACH, E. M. Differential effects of CD28 engagement and IL-12 on T cell activation by altered peptide ligands. **Journal of immunology**, v. 161, n.12, p.6614–21, 1998.

FAIR, J. M.; TAYLOR-MCCABE, K. J.; SHOU, Y.; MARRONE, B. L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.125, n.3-4, p.268-273, 2008.

FÁBRYOVÁ, K.; SIMON, M. Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. **General Physiology and Biophysics**, v.28, n.1, p.1–7, 2009.

FAUCI J. M.; STRAUGHN J. M. JR; FERRONE S.; BUCHSBAUM D. J. A review of B7-H3 and B7-H4 immune molecules and their role in ovarian cancer. **Gynecology Oncology**. 127, n.2; p.420-425, 2012.

GIERASCH, L M. Signal sequences. **Biochemistry**, v.28, n.3, p.923–30, 1989.

GUIMARÃES, M. C. C.; GUILLERMO, L. V. C.; MATTA, M. F. R.; SOARES, S. G.; DAMATTA, R. A. Macrophages from chickens selected for high antibody response produced more nitric oxide and have greater phagocytic capacity. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.140, p.317–322, 2011.

HARBER, M; SUNDSTEDT, A; WRAITH, D. Expert Reviews in Molecular Medicine. **Cambridge University Press**, 2000.

KAISER, P. Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v.39, n.5, p.309-324, 2010.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. **Journal of Molecular Biology**, v.157, p.105-132, 1982.

MALEK, M, HASENSTEIN, J. R.; LAMONT, S. J. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a Salmonella enteritidis resource population. **Poultry science**, v.83, n.4, p.544–549, 2004.

NABESHIMA, S.; MURATA, M.; KIKUCHI, K.; IKEMATSU, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. A reduction in the number of peripheral CD28+CD8+T cells in the acute phase of influenza. **Clinical & Experimental Immunology**, v.128, n.2, p.339-346, 2002.

ORABONA, C.; GROHMANN, U.; BELLADONNA, M. L.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; BOZZA, S.; VOLPI, C.; SALOMON, B. L.; FIORETTI, M. C.; ROMANI, L.; PUCETTI, P. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. **Nature immunology**, v.5, n.11, p.1134–42, 2004.

O'REGAN, M N, PARSONS, K. R.; TREGASKES, C.; YOUNG, J. R. A chicken homologue of the co-stimulating molecule CD80 which binds to mammalian CTLA-4. **Immunogenetics**, v.49, n.1, p.68–71, 1999.

PARSONS, K R; YOUNG, J. R.; COLLINS, B.; HOWARD, C. J. Cattle CTLA-4, CD28 and chicken CD28 bind CD86: MYPPPY is not conserved in cattle CD28. **Immunogenetics**, v.43, n.6, p.388–91, 1996.

PERAINO, J.; ZHANG, H.; HERMANRUD, C. E.; LI, G.; SACHS, D. H.; HUANG, C. A.; WANG, Z. Expression and purification of soluble porcine CTLA-4 in yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.82, p.270–278, 2012.

POWELL, F.; LAWSON, M.; ROTHWELL, L.; KAISER, P. Development of reagents to study the turkey's immune response: Identification and molecular cloning of turkey CD4, CD8alpha and CD28. **Developmental and comparative immunology**, v.33, n.4, p.540–6, 1999.

ROIIVAINEN M.; ALAKULPPI N.; YLIPAASTO P.; ESKELINEN M.; PAANANEN A.; AIRAKSINEN A.; HOVI T. A whole cell immunization-derived monoclonal antibody that protects cells from coxsackievirus A9 infection binds to both cell surface and virions. **Journal of Virological Methods**, v. 130, n.1-2, p.108-116, 2005.

RUDOLPH, R. & LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal**. v. 10, n. 1, p. 49-56, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA, 2001, 3 v.

STROUD, R M; WALTER, P. Signal sequence recognition and protein targeting. **Current opinion in structural biology**, v.9, n.6, p.754–759, 1999.

SUGIMOTO, S.; SONOMOTO, K. Molecular Chaperones in Lactic Acid Bacteria: Physiological Consequences and Biochemical Properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.106, n.4, p.324–336, 2008.

VENTURA, S & VILLAVERDE, A. Proteins quality in bacterial inclusion bodies. **TRENDS in Biotechnology**. v.24, p. 179-185, 2006.

WARD, S G. CD28: a signalling perspective. **The Biochemical journal**, v.318, p.361–377, 1996.

WONG, C K; LIT, L. C. W.; TAM, L. S.; LI, E. K.; LAM, C. W. K. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v.44, n.8, p.989–94, 2005.

WU, Z.; KAISER, P. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. **Immunobiology**, v.216, n.11, p.1177–83, 2011.

YE, X.; AVENDANO, S.; DEKKERS, J. C. M.; LAMONT, S. J. Association of twelve immune-related genes with performance of three broiler lines in two different hygiene environments. **Poultry Science**, v.85, n.9, p.1555-1569, 2006

YOUNG, J. R.; DAVISON, T. F.; TREGASKES, C. A.; RENNIE, M. C. Monomeric Homologue of Mammalian CD28 is expressed on Chicken T Cells. **Journal of immunology**, v.152, n.2, p.3848–3851, 1994.

ZHANG, X.; SCHWARTZ, J. D.; ALMO, S. C.; NATHENSON, S. G. Expression , Refolding , Purification , Molecular Characterization , Crystallization , and Preliminary X-ray Analysis of the Receptor Binding Domain of Human B7-2. **Protein Expression and Purification**, v.25, p.105–113, 2002.